Staphylococcus aureus, um importante patógeno, agente etiológico de doenças graves, responsável por prejuízos globais a economia

Giorgio Silva de Santana

Ano 2024

Staphylococcus aureus, um importante patógeno, agente etiológico de doenças graves, responsável por prejuízos globais a economia

Giorgio Silva de Santana

Ano 2024

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

Staphylococcus aureus, um importante patógeno, agente etiológico de doenças graves, responsável por prejuízos globais a economia

Diagramação: Ellen Andressa Kubisty
Correção: Maiara Ferreira
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: O autor
Autor: Giorgio Silva de Santana

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S232 Santana, Giorgio Silva de
Staphylococcus aureus, um importante patógeno, agente etiológico de doenças graves, responsável por prejuízos globais a economia / Giorgio Silva de Santana. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2024.

Formato: PDF
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
Modo de acesso: World Wide Web
Inclui bibliografia
ISBN 978-65-258-2191-7
DOI: https://doi.org/10.22533/at.ed.917241202

1. *Staphylococcus aureus*. I. Santana, Giorgio Silva de. II. Título.

CDD 616.995

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná – Brasil
Telefone: +55 (42) 3323-5493
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

DECLARAÇÃO DO AUTOR

O autor desta obra: 1. Atesta não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao conteúdo publicado; 2. Declara que participou ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certifica que o texto publicado está completamente isento de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirma a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhece ter informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autoriza a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

DECLARAÇÃO DA EDITORA

A minha mãe Lêda Fernandes Silva de Santana, pelo carinho, amor e ensinamentos que me dedicou durante toda minha vida, por acreditar em meu potencial, me incentivando a perseguir meus ideais e possibilitar minha dedicação na realização desse sonho.

AGRADECIMENTOS

Primeiro gostaria de agradecer a Deus, pelas conquistas até o momento, mas peço a Ele para me dar sabedoria e conquistar muito mais, pois sem sua benção eu não teria conseguido dar um passo. “Agradeço pelas inúmeras vezes que você me enxergou melhor do que eu sou. Pela capacidade de me olhar devagar, já que nessa vida muita gente me olhou depressa demais.” (Padre Fábio de Melo).

À minha mãe Lêda Fernandes Silva de Santana e ao meu irmão Giovane Silva de Santana, por me amarem e apoiarem na conquista dos meus sonhos, incentivando nos momentos de cansaço em que pensei em desistir, me mostrando que com empenho e força de vontade posso concretizar qualquer sonho e superar qualquer dificuldade. Vocês me tornaram quem sou hoje com caráter, moral e valores. Amo vocês!

Ao exemplo dado pela minha mãe, aos 63 anos ter aproveitado a oportunidade e voltado a estudar, concluído o ensino fundamental e médio em instituições públicas, com todos os problemas que a educação pública em nosso país enfrenta, com muita força de vontade e empenho ter conseguido ser aprovada no curso de Letras da Universidade Federal Fluminense. Mãe a senhora é meu exemplo e orgulho.

Ao meu orientador Dr. Fábio Aguiar Alves pela oportunidade e acreditar no meu trabalho, além de confiar a mim seus ensinamentos. Também por sua amizade e respeito.

A minha coorientadora Dr. Kátia Calvi Lenzi de Almeida, por confiar na minha capacidade e ter tido a coragem de assumir a responsabilidade em me orientar na realização desse projeto sendo leal e amiga.

A Universidade Federal Fluminense e ao Programa de Pós Graduação em Patologia, por todos os professores disponíveis a ajudar e orientar sempre dispostos a solucionar dúvidas e problemas.

A Prof. Maria Lucia Barreto por me ajudar na liberação de animais para que meu projeto pudesse ter início.

Ao Prof. Licínio Esmeraldo da Silva pela gentileza e paciência em me receber e me ajudar a desenvolver os dados estatísticos do meu projeto.

Ao Prof. Gilson Brito Alves Lima por permitir o uso do seu laboratório como local de estudo.

Ao Sr. Antônio Carlos do departamento de histologia do HUAP, por me ajudar na confecção das lâminas histológicas em um curto espaço de tempo.

As instituições colaboradoras: Departamento de Patologia do HUAP, Laboratório Universitário Rodolpho Albino e o Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia.

AGRADECIMENTOS

Aos professores da banca por gentilmente aceitarem o convite para examinar este trabalho.

A Prof. Vânia Gloria Silami Lopes por ter aceitado ser a revisora prévia deste trabalho.

A Prof. Karin Soares Gonçalves Cunha por toda colaboração desde o SAPro, sua presença foi indispensável nesse trabalho.

A minha amiga Manuela Ornelas de Abreu, por todo apoio e incentivo. Deus enfeita nosso caminho com seus anjos e você fez o trabalho direitinho. Obrigado pela partilha da nossa fé, e pela companhia durante as horas intermináveis de trabalho no laboratório, momento em que aproveitávamos para compartilharmos nossos conhecimentos.

As secretárias, Thereza e Anícia por toda a atenção e disponibilidade.

A todas as pessoas que ajudaram direta ou indiretamente na realização desse trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

Por fim, agradeço também as pessoas que tornaram minha vida e meu trabalho mais difíceis, com eles aprendi a ser cada vez mais forte e não desistir dos meus sonhos, pois para mim, vencer é nunca desistir.

“O principal objetivo da educação é criar pessoas
capazes de fazer coisas novas e não simplesmente
repetir o que as outras gerações fizeram.”

Jean Piaget

O presente trabalho visa avaliar a predisposição de camundongos *Mus musculus* (Swiss) ao desenvolvimento de sepse, e formação de biofilme em implante de cateter subcutâneo, por meio de inoculações com amostras bacterianas da espécie *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina e produtoras de leucocidina Panton-Valentine. A via endovenosa de inoculação comumente está relacionada a moralidade em 96 horas, causando colonização bacteriana em órgão vitais, como coração, baço, rins e pulmões. Os biofilmes formados em cateteres são grandes responsáveis por infecções, sendo um dos principais fatores causador da endocardite em humanos, nesse contexto as análises histopatológicas podem nos revelar a gravidade das infecções sistêmicas, também alterações na anatomia de órgãos e no funcionamento dos mesmos. Esse estudo demostra a importância da utilização de animais de laboratório, auxiliando na resposta para o tratamento de muitas doenças.

LISTA DE ABREVIATURAS

AdsA	Adenosina Sintetase A
Agr	*Acessory Gene Regulador*
AMP	Peptídeos Antimicrobianos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHI	*Brain Heart Infusion*
C	*Celsius*
CA-MRSA	*Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina Associado à Comunidade
ClfA e ClfB	Proteínas de Ligação e Aglomeração de Fibrinogênio A e B
cm	Centímetro
CMI	Concentração Mínima Inibitória
Cna	Proteína de Colágeno Ligante
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAse	Desoxirribonuclease
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
FnBPA e FnBPB	Proteínas de Ligação a Fibronectina A e B
g	Grama
HA-MRSA	*Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina Associado ao Ambiente Hospitalar
H e E	Hematoxilina e Eosina
HUAP	Hospital Universitário Antônio Pedro
IA	Inflamação Aguda
IgG	Imunoglobulina G
IL-10	Interleucina 10
LURA	Laboratório Universitário Rodolpho Albino
***lux*S**	Gene Responsável Pela Produção S-ribosylhomocysteinase
mL	Mililitro
mm	Micrômetro
mM	Milimol
MN	Mononuclear
MRSA	*Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina
MSCRAMM	Componentes de Superfície Microbianas Reconhecedores de Moléculas Adesivas da Matriz
MSSA	*Staphylococcus aureus* Sensível à Meticilina
Pb	Pares de Base
PBP (PPB)	*Penicillin Binding Protein*
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIA	Polissacarídeo Adesina Intercelular

PMN	Polimorfonuclear
PNAG	Polissacarídeo-1,6-acetil-N-glucosamina
pvl	*Panton-Valentine Leukocidin* (Gene)
PVL	*Panton-Valentine Leukocidin* (Proteína)
ROS	*Reative Oxygen Species* (Espécie Reativa de Oxigênio)
rpm	Rotação por Minuto
S. aureus	*Staphylococcus aureus*
SCC*mec*	*Staphylococcal Cassete Chromosome mec*
SCIN	*Scinderin*
SDMO	Síndrome de Disfunção de Múltiplos Órgãos
SE	Enterotoxinas Estafilocócica
SIRS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
spp	Espécie
STI	*Soft Tissue Infections*
ST8	*Sequence Type 8*
TBE - T	(**T**ris), ácido **B**órico e **E**DTA
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TSA	*Trypticase soy ágar*
TSST	Toxina da Síndrome do Choque Tóxico
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFF	Universidade Federal Fluminense
WT	*Wild Type* (Tipo Selvagem)
µL	Microlitro
µM	Micromolar

Introdução: *Staphylococcus aureus* é considerado o agente infeccioso mais comum, causando lesões purulentas e abcessos. Cepas resistentes a meticilina associadas à comunidade produtoras de Leucocidina *Panton-Valentine* são mais invasivas e estão clinicamente associadas a abscessos de pele, infecção em tecidos moles, pneumonia necrosante com propensão a causar bacteremia evoluindo para sepse, suas sequelas são mais graves que as causadas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina associado ao ambiente hospitalar. O emprego de técnicas invasivas como cateter intravascular em pacientes imunossuprimidos tem contribuído para o aumento de pacientes sépticos com alta mortalidade. A formação de biofilme é um fator determinante no desenvolvimento de doenças crônicas, inicialmente pela colonização de microrganismos em equipamentos médicos como cateteres, o mesmo pode causar bacteremia e colonizar outros tecidos e órgãos, levando o paciente a sepse. **Objetivo:** identificar infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina utilizando modelos experimentais de sepse e formação de biofilme em implante de cateter subcutâneo em camundongos. **Material e métodos:** foram utilizados 50 camundongos Swiss, 25 animais destinados ao experimento de sepse e 25 animais destinados ao experimento de biofilme, divididos em cinco grupos, com cinco animais em cada, inoculados com 50 μL de solução bacteriana na concentração 10^7 UFC/mL, grupo um inoculado com solução salina estéril, grupo dois inoculado com cepa sensível a meticilina *pvl* (-), grupo três com cepa sensível a meticilina *pvl* (+), grupo quatro com cepa resistente a meticilina *pvl* (+) e grupo cinco com cepa USA300 tipo selvagem, através da veia lateral da cauda. Após 96 horas foram eutanasiados para extração dos órgãos: coração, baço, rim e pulmões e análise macroscópica, com posterior secção, metade dos órgãos foi destinada a identificação da colonização tecidual e a outra destinada à análise histopatológica. Para o experimento de biofilme, foi inserido um fragmento de cateter no dorso através de uma incisão subcutânea, com posterior inoculação intradérmica distante um centímetro do local de inserção do fragmento de cateter. Após 96 horas os cateteres foram explantados e analisados macroscopicamente e avaliada a colonização através da cultura quantitativa. Um fragmento de tecido dorsal que revestia o cateter foi extraído de cada animal e destinado à análise histopatológica. **Resultados:** quanto ao experimento de sepse, a macroscopia dos órgãos mostrou alterações importantes na coloração e volume, tendo correspondência direta entre a intensidade das alterações observadas com a agressividade da cepa inoculada. Os resultados observados na histopatologia corroboraram com os achados na macroscopia, onde foram observadas infecções com diferentes intensidades em todos os órgãos analisados. No experimento de biofilme foi constatada colonização do cateter pela presença de película na superfície, confirmada pela cultura quantitativa. Ao analisarmos a histopatologia do tecido dorsal foram observados processos patológicos de grande importância. **Conclusão:** as infecções mais comuns causadas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina em modelo experimental de sepse em camundongos são as de tecidos moles, ao penetrar na corrente sanguínea o *S. aureus* causou bacteremia e colonizou importantes órgãos, causando disfunção e morte. Além disto, cepas CA- MRSA podem aderir a cateter e formar biofilme, através do qual podem causar lesões graves em pele e bacteremia.

PALAVRAS-CHAVE: *Staphylococcus aureus*, sepse, biofilme, camundongos.

ABSTRACT

Introduction: *Staphylococcus aureus* is considered the most common infectious agent, causing lesions and purulent abscess. Methicillin-resistant strains associated with community producing *Panton-Valentine* Leukocidin are more invasive and are clinically associated with abscesses, skin soft tissue infections and necrotizing pneumonia with propensity to cause bacteremia evolving into sepsis. Its sequels are more severe than those caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated to the hospital environment. The use of invasive techniques such as intravascular catheter in immunosuppressed patients has contributed to the increase of high mortality septic patients. The formation of biofilm is a determining factor in the development of chronic diseases, initially by colonization of microorganisms in medical devices such as catheters, because the biofilm formation. This isolate can cause bacteremia and colonize other tissues and organs, leading the patient to sepsis. **Objective:** Identify infections caused by *Staphylococcus aureus* methicillin- resistant using experimental models of sepsis and biofilm formation in subcutaneous catheter implantation in mice. **Material and methods:** 50 Swiss mice were used for the two models, 25 animals for experimental sepsis and 25 animals for biofilm experiment, divided into five groups, with five animals in each. The animals were inoculated with 50 *μ*l of a bacterial suspension in a 10^7 CFU/mL concentration. One group inoculated with sterile saline, one inoculated with methicillin-sensitive strain *pvl* (-), one with methicillin-sensitive strain *pvl* (+), the fourth with methicillin-resistant strain *pvl* (+) and the last with wild type USA300 strain through the lateral tail vein. After 96 hours they were euthanized to extraction of organs: heart, spleen, kidney and lungs and macroscopic analysis. Part of the organs were used to identification of tissue colonization and the other part was sent for histopathological analysis. For the experiment of biofilm, it was inserted a catheter fragment on the back through a subcutaneous incision, with posterior intradermal inoculation apart an inch from the place of insertion of the catheter fragment. After 96 hours the catheters were explanted and tested macroscopically and assessed the colonization by quantitative culture. A dorsal tissue fragment was extracted from each animal for histopathological analysis. **Results:** For the experiment of sepsis, the organs macroscopy showed important changes in color and structure, having direct correspondence between the intensity of the changes observed and the aggressiveness of the inoculated strain. The results observed in histopathology corroborate with the findings in the macroscopy, where infections were observed with different intensities in all analyzed organs. In the experiment of biofilm colonization of the catheter it was observed by the presence of biofilm on the surface, confirmed by quantitative culture. Analyzing the histopathology of the dorsal tissue it was observed pathological processes of great importance. **Conclusion:** The most common infections caused by *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant in experimental model of sepsis in mice are related to the soft tissue to penetrate the bloodstream. The *S. aureus* colonized major organs, causing dysfunction and death. In addition, CA-MRSA strains can adhere to catheter and form biofilm, through which can cause serious injury in skin and bacteremia.

KEYWORDS: *Staphylococcus aureus*, sepsis, biofilm, mice.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO

1.1 *Staphylococcus spp.*

Staphylococcus contém 37 espécies distintas, as principais de importância clínica relacionadas com infecções em humanos estão: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus*. (ANVISA, 2015)

1.2 *Staphylococcus aureus*: VIRULÊNCIA

A espécie *Staphylococcus aureus,* foi identificada no final de século XVII, sendo pertencente ao grupo dos cocos Gram-positivos, e geralmente encontradas agrupadas formando a aparência de cachos de uvas (Figura 01), o que caracteriza sua nomenclatura, oriunda do latin (staphylo = cachos de uva). Os *Staphylococcus* medem aproximadamente 0,5 a 1,5 μm de diâmetro, imóveis, não esporulados e, geralmente, não encapsulados. Apresenta-se em diversas formas: a) isolados, b) aos pares, c) em cadeias curtas, d) agrupados irregularmente. Esta disposição é decorrente da divisão celular que ocorre em três planos perpendiculares. (BRAKSTAD & MAELAND, 1997; JONGERIUS *et al*., 2007; OTTO, 2006)

Staphylococcus aureus cresce em meios comuns, caldo ou ágar simples, pH 7, à temperatura ótima de 37 °C. As colônias formadas em placa, após 18 a 24 horas de incubação, apresentam-se redondas, lisas e brilhantes, com coloração que varia desde o acinzentado até o amarelo-ouro. A pigmentação aumenta como o tempo de incubação, não chegando a ser formada nos casos de condições anaeróbicas, ou cultura em caldo. Em placas de ágar sangue, um halo de hemólise desenvolve-se em vários graus, em torno das colônias. (BRAKSTAD & MAELAND, 1997; JONGERIUS *et al*., 2007; OTTO, 2006)

Outra forma importante de identificação do *S. aureus* é o ágar-manitol- salgado, que é seletivo para esta espécie, uma vez que esta bactéria consegue fermentar o manitol, produz ácido lático e forma um halo amarelo ao redor da colônia (Figura 02), pode se desenvolver também na presença de 7,5% de cloreto de sódio, que estimula a produção de coagulase (enzima que caracteriza a espécie). (BRAKSTAD & MAELAND, 1997; JONGERIUS *et al*., 2007; OTTO, 2006)

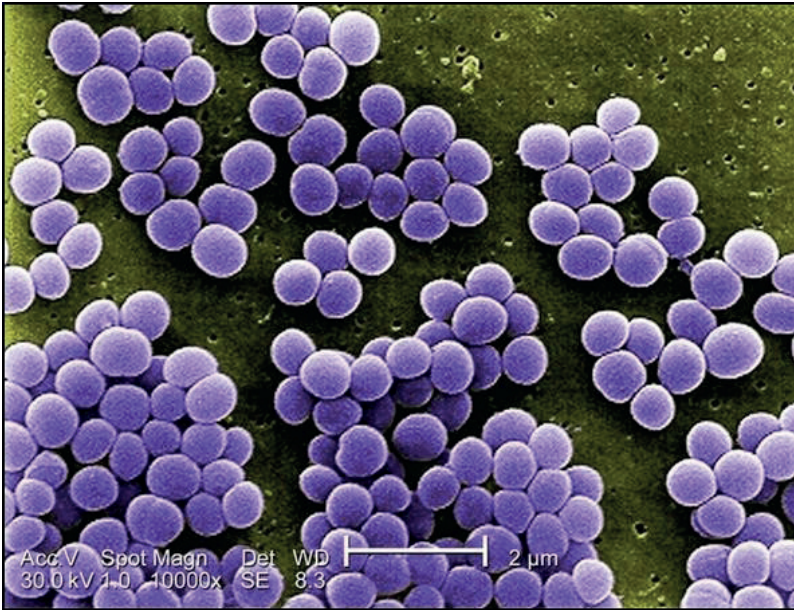
Figura 01 - Cocos Gram-positivos em microscopia eletrônica

Fonte: *Staphylococcus aureus,* dispostos de forma semelhante a cachos de uvas em microscopia eletrônica. Janice Haney Carr. CDC (2002)

Figura 02 - Cultura bacteriana em meio ágar hipertônico manitol

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF. A espécie *Staphylococcus aureus* e o grupo das espécies de *Staphylococcus* que não são *S. aureus.*

O *S. aureus* possui várias características que supostamente contribuem para a sua patogenia. Estes fatores não se encontram em todas as cepas de *S. aureus*, sendo geralmente descobertas novas e diferentes propriedades patogênicas (Quadro 01). (KUEHL *et al.*, 2009; MACHADO *et al.*, 2005; MAMIZUKA, 2005)

Com o objetivo de entender os mecanismos que envolvem sua transmissão e controle de disseminação, há vários estudos sendo feitos descrevendo cepas encontradas em diferentes ambientes e populações. (SCHUENCK *et al.*, 2008; VELAZQUEZ-MEZA, 2005)

Staphylococcus aureus coloniza a pele, as fossas nasais e do trato gastrointestinal de seres humanos. (KIM *et al.*, 2014; LOWY, 1998) Aproximadamente 20% a 30% dos adultos saudáveis são colonizados permanentemente e 75% a 80% podem ser colonizados transitoriamente por *Staphylococcus spp.* (alternando períodos colonizados e períodos não colonizados). (AMALARADJOU & VENKITANARAYANAN, 2014; DELEO & CHAMBERS, 2009;

EIFF VON *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2014) A transmissão ocorre através de fômites, secreção nasal, e, principalmente o contato manual direto dos profissionais da área de saúde com lesões abertas em pacientes infectados. Por essa transmissão facilitada a erradicação total das infecções hospitalares estafilocócicas torna-se cada vez mais difícil. (MICHELIM *et al.*, 2005)

A capacidade de colonização e a patogenicidade do *S. aureus* é consequência de seus fatores de virulência que são importantes na adesão, aquisição de nutrientes e evasão da resposta imunológica do hospedeiro. Estes fatores de virulência podem ser classificados em três categorias: (a) fatores relacionados com aderência a células do hospedeiro ou a matriz extracelular, fibrinogênio, fibronectina, colágeno e coagulase; (b) fatores relacionados com a evasão da defesa do hospedeiro, como as enterotoxinas estafilocócicas (SEs), SEA-SEE, SEG-J, SEK, SEL, SEP, SEM e SEO; a toxina da síndrome do choque tóxico (TSCT), proteína A, lipases e polissacarídeos capsulares, tipos 1, 5 e 8; (c) fatores relacionados com a invasão na célula do hospedeiro e a penetração nos tecidos como as toxinas alfa, beta, gama e delta hemolisinas, além da leucocidina *Panton- Valentine* (PVL). (OTTO, 2010; TAVARES, 2002)

O *S. aureus* contém polissacarídeos com o envolvimento de proteínas antigênicas, assim como, outras moléculas importantes, na estrutura da parede celular que podem induzir uma resposta imunológica no hospedeiro. (MAMIZUKA, 2005)

Quadro 01 - Fatores de virulência do *S. aureus* relacionados com sua patogênese e potencial infeccioso

	Patogenicidade	
Membrana Plasmática	Ácido teicóico	É um polissacarídeo específico, formado por fosfato de ribitol e N-acetilglucosamina, possui a habilidade de ativar a via alternativa do complemento e estimular a produção de citosinas.
	Proteína A	A proteína A está ligada ao peptideoglicano presente em 90% dos *S. aureus*, tem a capacidade de se ligar à porção Fc de IgG, dificultando a quimiotáxia, fagocitose, aumentam a atividade e produção de histamina, reações de hipersensibilidade e lesionam plaquetas.
Enzimas	β-Lactamases	Inativam os antimicrobianos do grupo β-lactâmico (penicilinas e cefalosporinas)
	Coagulase	Promovem a deposição de fibrina ao redor do microrganismo, dificultando a fagocitose celular.
	Estafiloquinase e estreptoquinase	Geram plasmina pela ativação de plasminogênio, a plasmina é capaz de dissolver a fibrina e o coágulo.
	Hialuronidase	Capaz de despolimerizar o ácido hialurônico, facilitando a propagação do microrganismo.
	Catalase	Converte o peróxido de hidrogênio (substância tóxica) em água e oxigênio.
	DNAse, lipase, protease e esterase	A DNAse é uma enzima que catalisa a clivagem hidrolítica de ligações fosfodiéster na estrutura do DNA. As lipases são enzimas que atuam sobre lipídeos, catalisando alguma reação química que estas moléculas possam sofrer. As proteases (proteínases, peptidases ou enzimas proteolíticas) são enzimas que quebram ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas (clivagem proteolítica) que corresponde a um mecanismo de ativação ou inativação de enzimas.
Toxinas	Alfa-toxina (α-hemolisina)	Lisa as hemácias e causa danos às plaquetas *in vivo*. No organismo humano causa intoxicação grave.
	Beta-toxina (β-hemolisina)	Responsável por degradar a esfingomielina, provocando lesões na membrana dos eritrócitos e hemólise.
	Delta-toxina (δ-hemolisina)	Propriedades detergentes são responsáveis por efeitos sobre as membranas de eritrócitos, macrófagos, linfócitos, neutrófilos e plaquetas. Pode inibir a absorção de água pelo íleo, devido à alteração do mecanismo de AMPcíclico, desencadeando uma diarréia aguda.
	Gama-toxina (γ-hemolisina)	Atividade hemolítica. Relacionada as enfermidades ósseas em humanos.
	Leucocidina (*Panton-Valentine*)	Toxina composta por dois componentes protéicos (*luk*S-PV e *luk*F-PV), alteram a permeabilidade da membrana permitindo a entrada de cátions (Ca^{2+}), destroem os leucócitos polimorfonucleares e os macrófagos por degranulação celular ocasionando citólise.
	Esfoliatina	Clivam o extrato granuloso da epiderme (síndrome da pele escaldada e impetigo bolhoso).
	Toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1)	Promove febre, choque e envolvimento de sistemas orgânicos múltiplos e erupção cutânea descamativa.
	Enterotoxinas A, B, C, D e E.	Toxinas protéicas pirogênicas, termostáveis, responsáveis pela intoxicação alimentar, vômitos e diarréias.

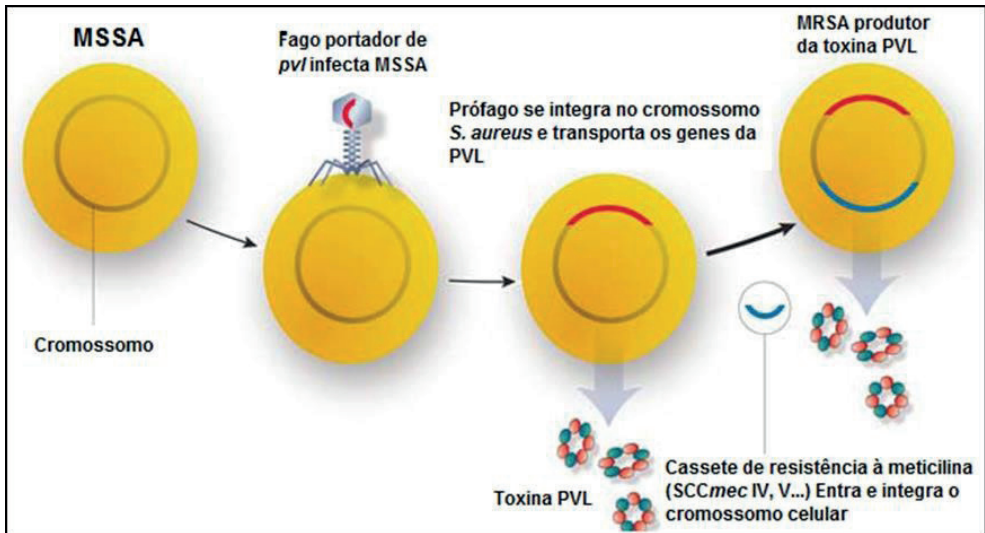
Fonte: Mamizuka (2005)

As doenças provocadas por *S. aureus* podem ser causadas pela própria bactéria decorrente da invasão direta dos tecidos, por bacteremia ou, exclusivamente, por toxinas que ela produz. O *S. aureus* é considerado o agente mais comum das infecções pirogênicas, as quais podem se localizar em um ou em múltiplos sítios, pele (primariamente) ou sobre ferimentos, queimaduras, incisões cirúrgicas, úlceras de decúbito, olhos, seios paranasais, ouvidos, pulmões (pneumonia), pleura, trato gastrointestinal, trato geniturinário, meninges, parênquima cerebral, ossos (osteomielite), articulações, endocárdio (endocardite), peritônio, sangue (bacteremia) e septicemia. (ANDRIOLO, 2005; BOLES & HORSWILL, 2008; PEREIRA, 2002) As infecções mais comuns são em tecidos moles (*soft tissue infections - STI*), (KIM *et al*., 2014; LOWY, 1998) as características patológicas das infecções causadas por *S. aureus* correspondem a formação de lesões purulentas e abcesso por infiltração de neutrófilos ao redor do local contaminado. (CHENG *et al*., 2009; KIM *et al*., 2014) As Infecções em humanos não produzem respostas imunes específicas e infecções persistentes ou recorrentes são comuns. (KIM *et al*., 2014; LESSA *et al*., 2010) Alguns isolados de *S. aureus* podem causar síndrome do choque-tóxico, doença de pele esfoliativa, e enterite em seres humanos. (KIM *et al*., 2014; LOWY, 1998) As toxinas secretadas são fatores determinantes de sua virulência. (BUKOWSKI *et al*., 2010; KIM *et al*., 2014; NOVICK *et al*., 2010)

1.3 LEUCOCIDINA PANTON-VALENTINE: UM AGRAVANTE EM INFECÇÕES POR *Staphylococcus aureus*

Um aspecto a ser considerado nas infecções causadas por *S. aureus* é a presença dos genes responsáveis por produzir a leucocidina Panton-Valentine, uma proteína que pertence a uma família bi-componente semelhante às toxinas leucocidinas produzidas por estafilococos, codificada pelo operon lukPV que codifica os genes *luk*F-PV e *luk*S-PV com um componente pertencente a classe F e um da classe S. O operon responsável pela produção da PVL está inserido em fagos como fSLT, fPVL, fSA2MW ou fSA2usa (Figura 03). (BOYLE-VAVRA & DAUM, 2007; DIEP *et al*., 2006; GILLET *et al*., 2002; LINA *et al*., 1999; SZMIGIELSKI *et al*., 1999)

Um fator genético importante de diferenciação entre cepas CA-MRSA (comunidade) e HA-MRSA (hospitalar) é a presença de um bacteriófago integrado (phiSLT), que carrega os genes responsáveis pela produção de PVL, esse bacteriófago está contido apenas em CA-MRSA, amplamente associado com a presença do cassete cromossômico SCC*mec* IV e esporadicamente com SCC*mec* V ou VI, mas não está normalmente associado aos cassetes SCC*mec* tipos I, II ou III (Figura 03). (DIEP *et al*., 2006; VANDENESCH *et al*., 2003)

Figura 03 - Modelo de inserção do gene *pvl* produzindo CA-MRSA

Fonte: *S. aureus* suscetível a meticilina (MSSA), infectado por um fago (phiSLT) insere o operon lukPV com os genes lukF-PV e lukS-PV codificadores da PVL. Posteriormente, ocorre a transferencia horizontal do cassete de resistência a meticilina (SCC*mec* IV, V ou V_t) portador do gene *mec*A em um local distinto do genoma bacteriano. Department of Pediatrics, Section of Infectious Diseases, University of Chicago, Chicago, IL, USA. Boyle-Vavra & Daum (2006)

Leucocidina Panton-Valentine é postulada amplamente como a principal determinante de virulência e condução a disseminação da epidemia de clones CA- MRSA em todo o mundo. (DIEP & OTTO, 2008) Relatos epidemiológicos clínicos fornecem convincente evidência de que o potencial de alta virulência CA-MRSA é associado com os genes *luk*S-PV e *luk*F-PV. (BOYLE-VAVRA *et al*., 2007; FENG *et al*., 2008) Clinicamente, está associada a abscessos de pele, infecção de tecidos moles e pneumonia necrozante em cepas CA-MRSA isoladas, (GILLET *et al*., 2002; LINA *et al*., 1999) embora os genes *pvl* sejam normalmente encontrados em apenas 2,0% dos isolados clínicos de *S. aureus*, têm sido encontrados na maioria das estirpes de CA-MRSA. (COSTERTON *et al*., 1999) As sequelas clínicas de infecções causadas por *S. aureus pvl*-positivas tendem a ser mais graves do que *pvl*-negativo. Em pneumonia, por exemplo, *S. aureus pvl*-positivo está associado à sepse, febre alta, leucopenia, hemoptise, derrame pleural e morte. (GILLET *et al*., 2002; BOYLE- VAVRA & DAUM, 2007)

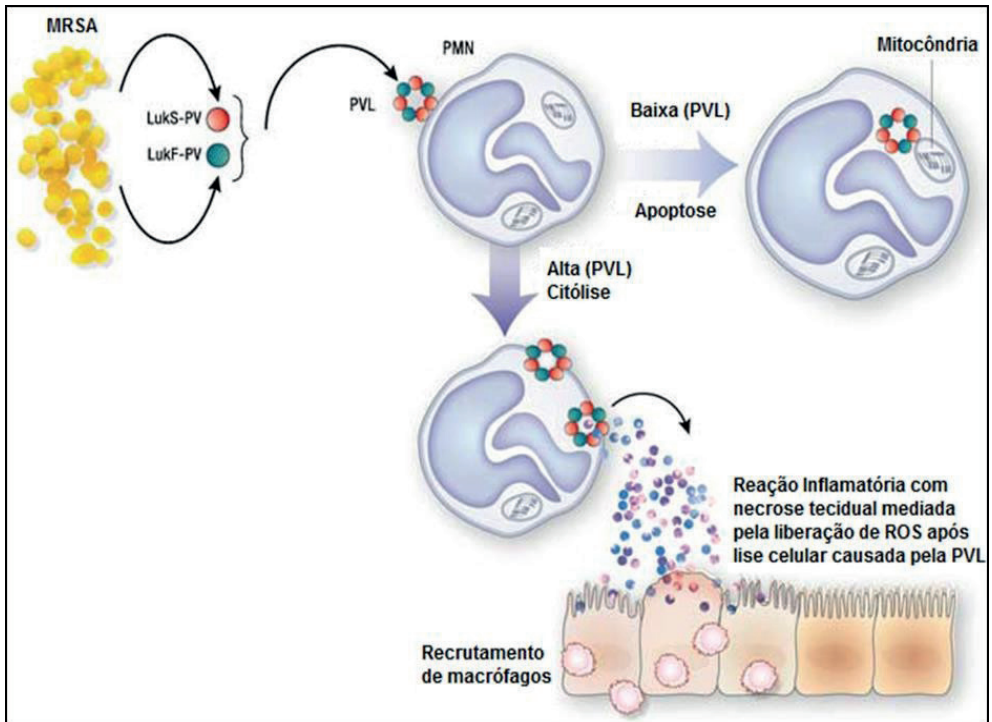
Cepas de MRSA da linhagem USA300 têm sido responsáveis por epidemias de infecções de pele em comunidades dos Estados Unidos. (FRIDKIN *et al*., 2005; KIM *et al*., 2014; TALAN *et al*., 2011) Estas estirpes expressar gene responsável por codificar a citotoxina PVL, (CHAMBERS, 2005; KIM *et al*., 2014; PANTON & VALENTINE, 1932) que se liga aos receptores do complemento C5aR e C5L2 de leucócitos humanos formando poros. (KIM *et al*., 2014; SPAAN *et al*., 2013) Cada vez mais, cepas de CA-MRSA contendo

pvl e genótipos (SCC*mec* IV, ST8) são relatadas em infecções hospitalares, o que vem a ser muito grave quando analisamos grau de virulência e imunodepressão ou imunossupressão de pacientes. Isto pode ser devido à preexistencia de colonização CA-MRSA *pvl*-positivo que encontram uma porta de entrada durante procedimentos invasivos realizados no hospital, podendo tornar as cepas CA-MRSA agora endêmicas em certos hospitais. (ENRIGHT *et al*., 2002; MAREE *et al*., 2006)

Frequentemente CA-MRSA são mais susceptíveis a tratamento por β- lactâmicos do que HA-MRSA, tais como a clindamicina, trimetoprim em associado com sulfametoxazole e doxiciclina. (HEROLD *et al*., 1997) Isolados de CA-MRSA também tendem a ser mais virulentos do que HA-MRSA, a maioria das doenças causadas por CA-MRSA são infecções da pele e tecidos moles, mas também podem causar doenças fatais, por serem altamente invasivos e de rápida progressão. CA- MRSA também está associado à sepse severa com pneumonia necrosante, que resultou na morte em um curto espaço de tempo (24 a 48 horas) em pacientes hospitalizados, também foi encontrada em associação com púrpura fulminante, coagulação intravascular disseminada (DIC) e hemorragia renal bilateral, características geralmente associada com síndrome Waterhouse-Friderichsen e meningococcemia. Algumas dessas síndromes invasivas foram ocasionalmente atribuídas a *S. aureus* antes de epidemia CA-MRSA. (ADEM *et al*., 2005; MILLER *et al*., 2005; MONGKOLRATTANOTHAI *et al*., 2003)

Um fator interessante é que inicialmente acreditava-se que PVL sozinha não era uma substância tóxica, pois a injeção intravenosa em coelhos resultou em granulocitopenia seguida por uma acentuada granulocitose, não sendo letal. Porém estudos de infecção cutânea com PVL purificado causaram lesões dermonecróticas em coelhos, esses resultados contribuiram para gerar a hipótese de que esta toxina tem um papel na infecção da pele e de tecidos moles. (DIEP & OTTO, 2008) Recentemente, estudos utilizando PVL purificada através de instilação nasal em ratos, mostraram que a mesma provocou lesões necróticas letais nos pulmões. (DIEP & OTTO, 2008) O fato de PVL poder causar dermonecrose em coelhos apóia a idéia de vantagem seletiva para a disseminação de CA-MRSA entre indivíduos saudáveis. Em pacientes hospitalazados as lesões cutâneas abertas facilitariam o acesso para CA-MRSA de lesões cutâneas próximas infectarem tecidos saudáves atráves do contato. (BOYLER-VAVRA *et al*., 2005; WARD & TURNER, 1980)

Os neutrófilos são os principais leucócitos humanos envolvidos na eliminação de bactérias invasoras e são os principais alvos da PVL, altas concentrações de PVL causam lise celular por formarem poros na membrana, porém em baixa concentração promovem a apoptose por se ligarem a membrana mitocondrial resultando na liberação de oxigênio na forma reativa (Figura 04). (GENESTIER *et al*., 2013; BOYLER-VAVRA *et al*., 2007)

Figura 04 - Modelo de como PVL pode mediar necrose tecidual

Fonte: Os dois componentes de PVL o LukF-PV e LukS-PV são secretados a partir de *S. aureus* antes de montarem um heptâmero, formam poros nas membranas de PMN. Altas concentrações de PVL causam lise em PMN, baixas concentrações seguem por uma via de interação com a membrana mitocondrial havendo a liberação de oxigênio em forma reativa (ROS) levando a apoptose celular. Com a lise celular ocorre a liberação de grânulos dos PMNs causando uma resposta inflamatória, resultando em necrose tecidual. Department of Pediatrics, Section of Infectious Diseases, University of Chicago, Chicago, IL, USA. Boyle-Vavra & Daum (2006).

Como modelos animais só podem reproduzir parcialmente o efeito dos patógenos no desenvolvimento das doenças em seres humanos, o efeito nulo da PVL purificada nos modelos de inoculação intravenosa em rato e coelho pode ser devido a uma interação específica de PVL com neutrófilos humanos. A interação patógeno-hospedeiro ainda não está clara, principalmente porque cepas CA-MRSA secretam não só PVL como outras exotoxinas com atividades leucolíticas. (DIEP & OTTO, 2008)

1.4 BIOFILME

A formação de biofilme é um fator determinante no desenvolvimento de doenças crônicas, que se inicia pela colonização de microrganismos em equipamentos médicos como cateteres e próteses ortopédicas. Quando um microrganismo infecta um determinado dispositivo, poderá ocorrer a formação de biofilme por vários fatores, entre eles: a adesão do patógeno de maneira irreversível, a quantidade de microrganismos e quantidade de fluído

que passará pelo local carregando e desestabilizando a aderência inicial, as características físico-químicas da superfície, e a expressão de determinados genes responsáveis pelas etapas de formação de um biofilme. (VUONG *et al*., 2000) Estima-se que cerca de 45% das infecções hospitalares são causadas por materiais estranhos contaminados ou dispositivos médicos implantados. (TARO *et al*., 2013)

Biofilme é definido como uma matriz polimérica com aspecto gelatinoso, aderida a uma superfície sólida, constituída por microrganismos, por substâncias poliméricas excretadas pelos mesmos e água, mas também pode englobar partículas sólidas provenientes do meio onde está inserido. (MENOITA *et al*., 2012)

Quando um dispositivo médico é implantado, rapidamente ocorre a cobertura por proteínas da matriz tecidual como as fibronectinas de ligação A e B (FnBPA e FnBPB), fibrinogênio e colágeno. A espécie *S. aureus* possui proteínas adesinas, que em muitos casos estão covalentemente ligadas ao peptidoglicano da parede celular. Estas proteínas possibilitam maior interação com o tecido do hospedeiro e são denominadas Componentes de Superfície Microbiana Reconhecedores de Moléculas Adesinas da Matriz (MSCRAMM), elas se ligam as proteínas do hospedeiro, colonizando-o e causando infecção. (ANTONIOS *et al*., 2006; CDC, 2002; FOX *et al*., 2006; JEFFERSON, 2004; O'RIORDAN & LEE, 2004) A família MSCRAMMs é um fator de grande importância para sua fisiologia e patogenia, (BEGUN *et al*., 2007) pertencem a está família: FnBPA, FnBPB, proteína de colágeno ligante (Cna) e proteínas de ligação e aglomeração de fibrinogênio A e B (ClfA e ClfB). (FOX *et al*., 2006)

Após *S. aureus* estabelecer interação com tecido do hospedeiro ou material sintético inserido ao tecido, espécies diferentes de *Staphylococcus* e espécies diferentes de microrganismos podem se associar com propriedade adesiva célula- célula na formação de biofilme, (OLIVEIRA *et al*., 2001) esta propriedade se deve a presença do gene *ica*ADBC, sua expressão promove a síntese de enzimas responsáveis por produzir Polissacarídeo de Adesão Intercelular (PIA). A união de várias espécies de bactérias fornece uma grande vantagem contra a eficácia de antibióticos, defesa imune inata como peptídeos antimicrobianos (AMPs) e fagocitose por leucócitos, que ficam prejudicados pela formação de biofilme. (JEFFERSON, 2004; OTTO, 2006) Por esses motivos, as infecções por bactérias que promovam a formação de biofilme são extremamente difíceis de serem extirpadas, sendo um grande desafio na produção de drogas. (OLIVEIRA *et al*., 2001)

Os fatores relacionados a adesão célula-célula e a formação da matriz extracelular compreendem várias móleculas como hidratos de carbono, proteínas e polímeros de ácidos nucleicos. Acredita-se que, o polímero N-acetil glucosamina (PNAG) e o polissacarídeo de adesão intercelular (PIA) estão essencialmente relacionados com a adesão célula-célula. (LINA *et al*., 1999; THONDEL *et al*., 2011)

Biofilmes possuem diferentes perfis de expressão gênica quando comparados com células cultivadas em forma planctônicas. Sendo um grande e complexo fenótipo que afeta

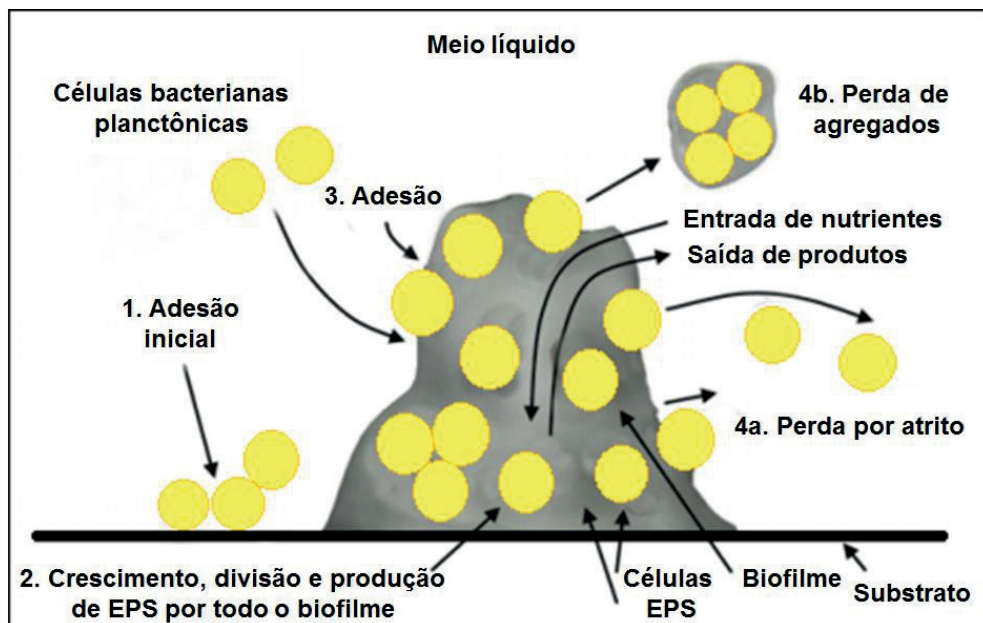
na fisiologia e expressão de genes das células que estão envolvidas no mesmo. (BOYLE-VAVRA & DAUM, 2007; VELAZQUEZ-MEZA, 2005)

O *S. aureus* é habil em produzir moléculas que inibem a resposta imune inata e adquirida. (DIEP & OTTO, 2008) O exopolissacarídeo PIA, produzido por várias estirpes de *S. aureus*, forma uma cápsula ao redor do biofilme, impedindo assim, o reconhecimento dos microrganismos pelo sistema imunológico. (ATAHAN *et al*., 2009; O'GARA, 2007; THONDEL *et al*., 2011) A proteína A, encontrada na superfície da membrana de *S. aureus,* interage com a região invariável da IgG produzindo uma camada não específica ao redor da célula bacteriana para inibir a fagocitose, evitando a formação da resposta imune específica. (DERESINSKI, 2005) Além de todos esses fatores, *S. aureus* ainda produz outros produtos que interferem na atuação do sistema complemento como o fibrinogênio e SCIN (proteína estafilocócica considerada mais eficiente inibidora da via complemento, da lectina, da clássica e alternativa, através de sua ligação de superficie da C3 convertase). Previne eficientemente a fagocitose, morte por neutrófilos e a produção de quimiocina C5a (BLOM *et al*., 2009; FOSTER *et al*., 2009; ROOIJAKKERS *et al*., 2005) de ligação à proteína extracelular ao fibrinogênio (Efb), esses produtos fornecem proteção para as células bacterianas sejam de mesma espécie ou de espécie diferente que estejam no interior do biofilme. Entretenado o biofilme, quando espesso, impede não só a penetração de antibióticos como também de nutrientes e O2, ocorrendo uma diminuição do metabolismo das células que estão em seu interior. (HIRAMATSU *et al*., 1997)

Quando a proliferação das células que compõem o biofilme atinge uma densidade limítrofe, as mesmas começam a se desprender, ficando suspensas no meio como êmbolos sépticos e causando infecções em outros tecidos e órgãos. (FOSTER, 2005) Esta fase chamada destacamento é ativada por um sistema de comunicação intercelular denominado *quorum-sensing* mediado por um *acessory gene regulador* (*agr*). (BEGUN *et al*., 2007; SRINIVASAN *et al*., 2002; THONDEL *et al*., 2011) O sistema *quorum-sensing* é um regulador capaz de induzir a produção de peptídios auto-indutores que promovem a comunicação entre as células que compõe o biofilme com as células que não estão inseridas (Figura 5). (DO CARMO *et al*., 1994; MACK *et al*., 1996; SRINIVASAN *et al*., 2002)

O locus *agr* durante a infecção por bactérias Gram-positivas possui uma função controversa. Ao invés de sua expressão ser favorável para a formação do biofilme e virulência, sua ativação pode diminuir a virulência e a capacidade de compor o biofilme. (ASSEF *et al*., 1992; DO CARMO *et al*., 1994; RAMIREZ *et al*., 2012) O gene *agr* promove o sistema *Quorum-sensing agr*, que regula a expressão de peptídeos com função de detergência, diminuindo a aderência célula-célula, que por sua vez diminui a formação de biofilme e favorece o destacamento das células que retornam ao seu estado livre no meio, enquanto a expressão do gene *lux*S está relacionado com a diminuição da capacidade na produção de polissacarídeos formadores de biofilme, reduzindo a interação célula-célula (Figura 5). (DO CARMO *et al*., 1994; KIEDROWSKI *et al*., 2011; STORTI *et al*., 2007)

Staphylococcus aureus pode invadir macrófagos mantendo como células hospedeiras e impedindo a fagocitose de células que compõe o biofilme, no entanto sua função e patogênese como patógeno intracelular ainda não está bem estabelecida. (KIEDROWSKI & HORSWILL, 2011)

Figura 05 - Ciclo de vida do biofilme

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF "Etapas: (1) Transporte de células livres do meio líquido para a superfície sólida e sua subsequente fixação; (2) Crescimento e divisão celular fixas, decorrente de nutrientes provenientes do líquido onde está imerso, juntamente com a produção de EPS; (3) Fixação de células bacterianas flutuantes (e outras partículas), contribuindo para o acúmulo do biofilme; (4) Dispersão/liberação de material celular por vários tipos de mecanismos: (a) erosão superficial (perda celular individual), (b) descolamentos, (c) abrasão e (d) ataque pelo sistema imune." (MENOINA *et al*., 2012)

1.5 INFECÇÃO E SEPSE

Em humanos a sepse é definida como uma resposta inflamatória sistêmica do hospedeiro frente a uma infecção, que segue com a falência de múltiplos órgãos. Ocorre primeiramente pela colonização com a presença do agente infeccioso em um determinado sítio ou tecido causando infecção, através da infecção, bactérias viáveis atingem a corrente sanguínea, podendo ser recuperadas através da hemocultura. A produção excessiva de mediadores inflamatórios e a excessiva ativação de células inflamatórias em um nível que o organismo perde o controle de seus metabólicos levam a sepse e a SIRS. (BONE, 1991). A SIRS (síndrome da resposta inflamatória sistêmica) é caracterizada por um conjunto de sinais clínicos, para que seja constatado seu estabelecimento é necessário pelo menos dois

critérios: 1) temperatura corporal > 38° ou < 36°; 2) frequência cardíaca > 90 batimentos por minuto; 3) frequência respiratória > 20 incursões por minuto ou um PaCO2 < 32 mmHg; 4) a leucometria com a contagem de glóbulos brancos > 12.000/mm^3 ou < 4.000/mm^3 ou bastonetes > 10%. A sepse será, portanto, uma SRIS secundária à infecção.

A Sepse grave ou severa está associada com disfunção orgânica, hipoperfusão orgânica ou ainda à hipotensão arterial. (PEREIRA *et al.*, 1998; TAVARES & MARINHO, 2012) A hipotensão arterial sistólica em pacientes sépticos pode ser < 90 mmHg (ou pressão arterial média menor que 60 mmHg) a despeito da reposição volêmica adequada, ocasionado o Choque Séptico, quando o paciente não apresenta nenhuma outra causa para hipotensão. (TAVARES & MARINHO, 2012) A sepse pode ainda levar a Síndrome da Disfunção de Múltiplos Órgãos (SDMO), que corresponde a alterações nas funções orgânicas em pacientes gravemente enfermos, dificultando a manutenção da homeostasia, sendo possível ser mantida apenas por suporte avançado de vida. (PEREIRA *et al.*, 1998; TAVARES & MARINHO, 2012) O comprometimento de muitos órgãos pode ainda evoluir para síndrome da insuficiência dos mesmos, com alta mortalidade. (BONE, 1991; PARRILO, 1993; RÉA, 1996)

O choque séptico é uma das causas mais frequentes de morte em unidades de terapia intensiva. A crescente população de idosos acima de 65 anos, a presença de doenças debilitantes, o emprego de técnicas invasivas (cateter intravasculares, tubo endotraqueal entre outros), pacientes imunossuprimidos e infecções hospitalares, tem sido fatores que contribuem para o aumento de pacientes sépticos. (BONGARD & SUE, 1994; KNOBEL, 1994) A mortalidade causada por sepse ultrapassa 40%, estima-se que 35 a 40% dos pacientes sépticos evoluem para o estado de choque. (PEREIRA *et al.*, 1998)

Staphylococcus aureus é um microrganismo muito propenso a causar sepse, está associado inicialmente a bacteremia com formação de lesões e abcesso em muitos tecidos de órgãos diferentes. (KIM *et al.*, 2014; KLEVENS *et al.*, 2007; STEARNS-KUROSAWA *et al.*, 2010) Em camundongos, a inoculação endovenosa de *S. aureus* também desencadeia disseminação de bactérias através do sangue para os tecidos dos órgãos, onde estabelecem lesões e abscesso em tecidos musculoesquelético, vasculares, cérebro, pulmão, coração, fígado, baço e rim. (CHENG *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2014) As manifestações clínicas da sepse decorrem do processo infeccioso primário, do processo inflamatório subjacente e das disfunções orgânicas instaladas ou em instalação. (BORGES, 1996; RÉA, 1996) Os sintomas e sinais são decorrentes da ofensa infecciosa primária e da localização do foco de infecção inicial. (RÉA, 1996) As manifestações clínicas inflamatórias secundárias são inespecíficas e incluem a febre ou hipotermia, taquicardia, taquipnéia e alcalose respiratória, leucocitose ou leucopenia com aumento do número de bastonetes, hipermetabolismo sistêmico, consumo elevado de oxigênio, hipoperfusão sistêmica e acidose metabólica em um estado circulatório hiperdinâmico. (BORGES, 1996; RÉA, 1996) As disfunções pulmonares e renais são comuns nos estágios iniciais de sepse, também por fazerem parte da avaliação

clínica rotineira. (BORGES, 1996; SHOEMAKER, 1995) A hipotensão sistêmica, defeitos microcirculatórios regionais, hipoxia tecidual e ativação da cascata inflamatória estão relacionados às lesões de múltiplos órgãos que caracterizam a evolução clínica da sepse para a sepse severa. (BONE, 1991) Em estágios mais tardios podem ocorrer alterações do estado de consciência decorrentes de disfunções neurológicas, taquipnéia (hipoxemia ou hipocapnia), febre e leucocitose, acidose metabólica (láctica), intolerância periférica à glicose, oligúria, elevação da uréia e creatinina plasmáticas, hipermetabolismo levando a desnutrição. (BONE, 1991; BORGES, 1996; SHOEMAKER, 1995)

Entretanto em modelo murino não a parâmetros até o presente momento na literatura que caracterize a sepse.

Duas proteínas de superfície produzidas por *Staphylococcus aureus* desempenham um papel chave na patogénese da sepse, elas correspondem AdsA e a ClfA. A adenosina sintetase (AdsA) é uma molécula de sinalização durante a infecção, contribui como fator de evasão dos mecanismos de defesa inato e adaptativo, importantes para a destruição de bactérias patogênicas pelo hospedeiro (KIM *et al.*, 2014) Ao invadir a corrente sanguínea *S. aureus* produz AdsA aumentado o nível extracelular de adenosina. A adenosina extracelular interage com os receptores de adenosina (A1, A2A, A2B e A3), membros da família dos receptores acoplados da proteína G (GPCRs), essa interação do receptor com adenosina ativa as cascatas de sinalização anti-inflamatórias, causando a inibição da agregação plaquetária, degranulação de neutrófilos e, ainda, aumento da produção de interleucina 10 (IL-10), uma citocina anti-inflamatória. (KIM *et al.*, 2014) A presença da proteína AdsA na bactéria *S. aureus* é necessária para sobrevivência da mesma no interior dos neutrófilos, possibilitando à bactéria escapar dos atributos bactericidas dos leucócitos. A permanência da bactéria no neutrófilo depende de sua capacidade de se esquivar de todas as repostas bactericidas dessas células, incluindo ROS (*reactive oxygen species*), enzimas hidrolíticas e defensinas peptídicas. (GARZONI & KELLEY, 2009; KIM *et al.*, 2014) A proteína de ligação e aglomeração de fibrinogênio A (ClfA) de superfície. (KIM *et al.*, 2014; McADOW *et al.*, 2011) A ClfA liga-se ao domínio D do fibrinogénio e fibrina, tornando as células revestidas com fibrinogênio impedindo o reconhecimento de opsoninas, reduzindo a opsonofagocitose por neutrófilos humanos e fagocitose por macrófagos, (GANESH *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2014; McDEVITT *et al.*, 1997) também promove oclusões vasculares por bactérias aglutinadas em tecidos dos órgãos. (KIM *et al.*, 2014; McADOW *et al.*, 2011)

1.6 EVOLUÇÃO DA RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1928, se inicia a antibioticoterapia como solução para as infecções estafilocócicas em 1942. Infelizmente, apesar da eficiência inicial da penicilina, o *S. aureus* passou a desenvolver resistência a este beta-lactâmico por produzir uma beta-lactamase (penicilinase) capaz de hidrolisar

o anel beta-lactâmico da penicilina, inativando-a. (FENG *et al*., 2008; LIU *et al*., 2011; SHIRTLIFF *et al*., 2002)

Em 1960, foi descoberta uma droga do grupo das penicilinas, a meticilina, que não era inativada pela beta-lactamase, assim como, as cefalosporinas. (LIMA *et al*., 2011; ROBINSON & ENRIGHT, 2004; TAVARES, 2002) Entretanto na década de 70 com uso desses antibióticos em animais e humanos de forma inadequada levou à seleção de cepas resistentes aos beta-lactâmicos e às cefalosporinas, sendo chamadas de MRSA (*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*). (DELEO & CHAMBERS, 2009; KIM *et al*., 2014) Estes MRSA eram, rapidamente, disseminados em ambientes hospitalares restando apenas a vancomicina e a teicoplanina como opções de tratamento das infecções por *Staphylococcus spp*. (LIMA *et al*., 2011; ROBINSON & ENRIGHT, 2004; TAVARES, 2002) Estima-se que 89% dos isolados *S. aureus* sejam MRSA. (AMALARADJOU & VENKITANARAYANAN, 2014) A resistência a meticilina é determinada por um gene cromossômico (*mec*A), endógeno da bactéria que codifica modificações no receptor de ação dos beta- lactâmicos, estimulando a produção de uma proteína (PPB2) com baixa afinidade aos β-lactâmicos. (ATSHAN *et al*., 2012; BERGER-BACHI & ROHRER, 2002; TAVARES, 2002)

A terapêutica recomendada no tratamento de infecções causadas por MRSA são os antibióticos: Vancomicina, Daptomicina e a Linezolida. (ARBEIT *et al*., 2004; KIM *et al*., 2014; LIU *et al*., 2011) A vancomicina é uma droga conhecida desde 1958, eficiente no tratamento de MRSA, embora nefrotóxica e ototóxica. (O'GARA, 2007; OTTO, 2008; ROBINSON & ENRIGHT, 2004; TAVARES, 2002) Entretanto estudos atuais relatam algumas limitações da vancomicina em infecções graves, tem ocorrido aumento crescente da Concentração Mínima Inibitória (CMI). Relatos mostram que já há dois mecanismos de resistência por microrganismos para evadir o tratamento a vancomicina. (CHAIEB *et al*., 2011; FORSGREN & NORDSTROM, 1974; KIM *et al*., 2014; OTTO, 2008) O primeiro foi descrito em 1996 no Japão, que evidencia espessamento da parede celular bacteriana (FRYMOYER *et al*., 2009) e o segundo, em 2002 nos EUA, através de um mecanismo relacionando uma alteração no gene *van*A, (PATTI *et al*., 1994) por modificação do sítio de ação da vancomicina semelhante ao enterococos. (CASSETTARI *et al*., 2005; CLIMO *et al*., 1999)

Para os casos de falha no tratamento de infecções com a vancomicina, têm sido propostas novas alternativas na antibioticoterapia e novas opções terapêuticas estão sendo utilizadas como, por exemplo, os antibióticos: daptomicina, rifampicina, linezolida em doses altas ou específicas para a eliminação do patógeno. (DONELLI *et al*., 2007; KUBICA *et al*., 2008)

A partir do ano de 1990 várias epidemias por *S. aureus* associados à comunidade (CA-MRSA) têm sido descritas causando doenças graves na população. Até hoje cinco linhagens clonais CA-MRSA foram identificadas associadas a essas epidemias: Pandêmico (USA300, CC8), o clone Meio-Oeste (USA400, CC1), o clone Europeu (CC80), o clone

Southwest-Pacífico Oceania (CC30), e o clone do Pacífico (CC59). (DIEP & OTTO, 2008; KARAUZUM *et al*., 2013) Outro fator é comum entre esses clones, a presença do SCC*mec* IV, todos portadores do operon lukPV que codifica a Leucocidina *Panton-Valentine*. (DIEP & OTTO, 2008; KARAUZUM *et al*., 2013)

Tais dados anteriormente citados demonstram a necessidade da elaboração de estudos que possibilitem a maior compreensão na atuação de cepas *S. aureus* associados à comunidade (CA-MRSA) contendo *pvl*.

A aquisição da resistência aos beta-lactâmicos por este microrganismo propiciou maior disseminação em ambientes hospitalares. Além da produção da leucocidina *Panton-Valentine* por CA-MRSA agrega maior virulência, o que torna um dos principais agentes infecciosos causadores de sepse em diferentes países.

Atualmente, cepas produtoras de PVL são encontradas em infecções hospitalares, o que vem a ser um grave problema de saúde pública ao analisarmos a virulência desse agente etiológico, devido as sequelas clínicas de infecções causadas por *S. aureus pvl*-positivo, serem mais graves quando comparadas com *pvl*-negativo e a imuno-depressão dos pacientes acometidos.

Esse estudo pode ser uma porta para elucidar várias questões em relação à utilização da terapêutica apropriada no tratamento das infecções causadas por *S. aureus*, como também infecções associada ao uso de cateter em pacientes hospitalizados por formação de biofilme. Podendo assim ser minimizados através de pesquisas científicas e desenvolvimento de modelos experimentais que reproduzam a fisiopatologia da doença em humanos, servindo para o estudo de sua patogênese e descoberta de novas alternativas de tratamento medicamentoso ou procedimental.

OBJETIVO

2.1 GERAL

Avaliar a predisposição ao desenvolvimento de sepse e formação de biofilme em implante de cateter subcutâneo, em infecções causadas por cepas *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina e produtoras de leucocidina *Panton- Valentine* utilizando modelos experimentais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Verificar o percentual de mortalidade, por cada grupo após o desafio no prazo de 96 horas de observação, nos modelos de sepse e biofilme;

2.2.2 Identificar e quantificar as unidades formadoras de colônias em extratos de tecido cardíaco, baço, rim esquerdo e pulmão, em cada grupo, através de cultura celular no modelo de sepse;

2.2.3 Quantificar em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em cateter subcutâneo implantado para avaliar a formação de biofilme em cada grupo, através de cultura celular;

2.2.4 Identificar as alterações anatomopatológicas, presentes em coração, baço, rim, pulmão, no modelo de sepse, e tecido dorsal, no modelo de biofilme.

ÉTICA

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa Animal da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal Fluminense (UFF) com o número de registro: 439/2013 (anexo 01). Todos os procedimentos atenderam as exigências previstas no projeto de lei nº 11.794/2008 (Brasil, Lei nº 11.794, 2008), que estabelece procedimentos para o uso científico de animais e está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal da Sociedade Brasileira de Ciência e Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA).

MATERIAL E MÉTODO

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 50 camundongos Swiss adultos jovens com seis semanas de vida, do gênero masculino pesando aproximadamente 34 g, todos procedentes do NAL (Núcleo de Animais de Laboratório) da Universidade Federal Fluminense, sendo 25 camundongos em cada experimento (sepse e biofilme). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, separados por grupos de acordo com as características das cepas em estudo, recebendo ração comercial e água filtrada *ad libitum*, mantidos em ciclos de claro-escuro, em temperatura ambiente entre 24 + ou - 2 °C, de acordo com o protocolo utilizado na criação de animais pelo biotério do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal Fluminense onde foi executada toda a metodologia empregada nesse estudo.

Os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos por cada experimento contendo cinco animais em cada grupo (Figura 06). Todos os procedimentos realizados nos animais que poderiam resultar em ansiedade e/ou dor foram conduzidos sob anestesia por inalação em campânula fechada por saturação de Isoflurano FORANE® (2-cloro-2-(difluorometoxi)-1,1,1-trifluoro-etano), (KIEDROWSK *et al*., 2011) seguindo os seguintes critérios: observação da respiração do animal que deve ser profunda e regular, ausência de reflexo, ou seja, o animal não pode responder a estímulos, do contrário a anestesia não estará no plano anestésico adequado para a intervenção cirúrgica. Durante a administração da anestesia inalatória, foi observada a condição de saúde do animal e principalmente se não apresentava alguma doença no trato respiratório, fator que pode interferir na administração do anestésico. (MEDRAZI *et al*., 2004; NEVES, 2013)

No experimento de sepse os 25 animais foram inoculados conforme distribuição apresentada no item 3.2, com 50 μL de uma suspensão bacteriana que está a 10^7 UFC/mL em solução salina estéril (0,9% de NaCl), com exceção do grupo controle que recebeu somente soro fisiológico estéril.

No experimento com formação de biofilme também foram utilizados 25 animais, inoculados com 50 μL de suspensão bacteriana (item 3.2) que está à 10^7 UFC/mL em solução salina estéril (0,9% de NaCl), com exceção do grupo controle que recebeu somente soro fisiológico estéril.

4.2 DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS PARA OS MODELOS DE INFECÇÃO E SEPSE E FORMAÇÃO DE BIOFILME

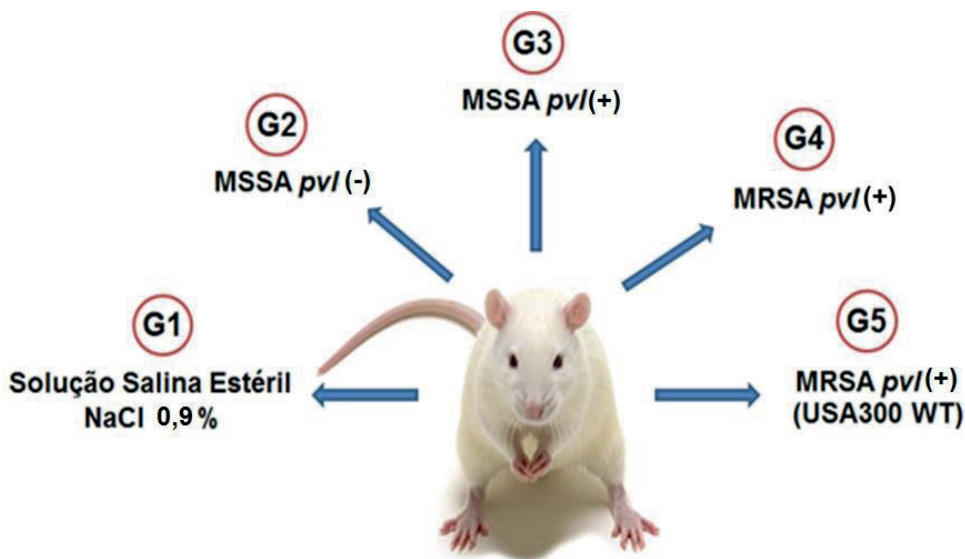
Grupo um (G1) - Inoculado com solução salina estéril.

Grupo dois (G2) - Inoculado com cepa sensível a meticilina (MSSA) e ausência dos genes *mec*A e *pvl.*

Grupo três (G3) - Inoculado com cepa sensível a Meticilina (MSSA), ausência do gene *mec*A, portando gene *pvl*.

Grupo quatro (G4) - Inoculado com cepa resistente a meticilina (MRSA) portando o gene *mec*A e *pvl*.

Grupo cinco (G5) - Inoculado com cepa resistente a meticilina (MRSA), portando o gene *mec*A e *pvl* (USA300 WT).

Figura 06 - Divisão dos animais de acordo com os grupos e seus respectivos inóculos

Fonte: Foto ilustrativa do camundongo Swiss - Centro de Bioterismo da FMUSP.

4.3 AMOSTRAS BACTERIANAS

Todas as amostras foram previamente fenotipadas e genotipadas para detecção dos respectivos genes de virulência. As origens das amostras estão distribuídas de acordo com o quadro dois.

Quadro 02 - Distribuição e origem dos inóculos contendo amostras bacterianas nos diferentes grupos experimentais

Grupos	Desafio	Características
1	Grupo controle	Soro fisiológico estéril - 0,9% de NaCl (ausência de microrganismo).
2	**MSSA *pvl* (-)**	Amostra proveniente de colonização nasal armazenada no banco de amostras do Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia – Laboratório Universitário Rodolpho Albino - LURA - Universidade Federal Fluminense.
3	**MSSA *pvl* (+)**	Amostra proveniente de colonização nasal armazenada no banco de amostras do Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - Laboratório Universitário Rodolpho Albino - LURA - Universidade Federal Fluminense.
4	**MRSA *pvl* (+)**	Amostra proveniente de infecção pulmonar armazenada no banco de amostras do Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - Laboratório Universitário Rodolpho Albino - LURA - Universidade Federal Fluminense.
5	**MRSA *pvl* (+) USA300 WT**	Amostra proveniente de infecção doada generosamente pelo Prof. Binh An Diep da University of California, San Francisco (UCSF) e armazenada no banco de amostras do Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - Laboratório Universitário Rodolpho Albino - LURA - Universidade Federal Fluminense.

4.3.1 Identificação da espécie *Staphylococcus aureus*

4.3.1.1 Fermentação do manitol-salgado: as amostras coletadas foram semeadas em ágar-manitol-salgado e as fermentadoras de manitol (que apresentarem halo amarelo), foram submetidas ao teste da catalase. (DIFCO & BBL MANUAL, 2003)

4.3.1.2 Produção de catalase: foi colocada uma colônia da amostra positiva para manitol em uma lâmina de vidro de forma asséptica, em seguida com pipeta tipo *Pasteur* descartável foi gotejado peróxido de hidrogênio a 3,0%. Com as colônias positivas para catalase foi feito o teste da coagulase. (MURRAY *et al*., 2007)

4.3.1.3 Produção de coagulase: foi adicionada uma colônia em tubo de ensaio estéril contendo 500 μL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) por 24 horas em estufa de crescimento microbiológico em temperatura 36 a 37 °C. Foi utilizado plasma de coelho liofilizado hidratado com solução salina estéril (0,9% de NaCl). Em condições de esterilidade foi adicionado 150 μL do inóculo em um tubo estéril e 300 μL do plasma, incubou-se em estufa de crescimento microbiológico em temperatura 36 a 37 °C, observando em intervalos de uma hora por quatro horas. Foram separadas as amostras positivas (formadoras de coágulo). As que não formaram coágulos nesse período permaneceram na estufa pelo período de 24 horas. As amostras positivas no período de quatro horas e no período de 24 horas foram cultivadas para análise genotípica. (McDONALD & CHAPIN, 1995)

3.3.2 Métodos moleculares

3.3.2.1 Extração do ácido desoxirribonucleico bacteriano: foi realizada de acordo com protocolo estabelecido por Schuenck *et al.* (2008). Em condições de esterilidade, foram coletadas colônias e suspensas em 1,0 mL de água Mili-Q esterilizada em um microtubo (Qiagen) isento de DNAse com capacidade para 1,5 mL, homogeneizada no vórtex por um minuto, centrifugada por um minuto em velocidade 13.000 rpm, após a centrifugação foi descartado 500 μL do sobrenadante. Posteriormente foi resuspensa com 200 μL de água Mili-Q esterilizada homogeneizando no vórtex por mais um minuto, a solução foi encubada 100 °C por 10 minutos. Após o período de incubação, centrifugada por um minuto em velocidade 13.000 rpm. O sobrenadante contendo o DNA bacteriano foi coletado e usado na PCR. O DNA foi armazenado em microtubo em temperatura aproximada - 20 °C.

3.3.2.2 Reação da polimerase em cadeia do gene *mec*A: foi realizada como descrito por Oliveira & Lencastre (2002), utilizando os oligonucleotídeos *mec*A P4: 5`-TCCAGATTACAACTTCACCACG-3` e *mec*A P7: 5`-CCACTTCATATCTTGTAACG-3` (Tabela 01), condições da reação: tampão 10×1 (Invitrogen); MgCl2 a 2 mM (Invitrogen); dNTP a 200 µM; 1,5 U AmpliTaq Gold® DNA polimerase, 1 µM de cada primer; 10,7 μL de água Mili- Q estéril; utilizamos 2 µL de DNA (amostra). O volume final da reação foi de 25 μL. A amplificação ocorreu nas seguintes condições: 94 °C / 30 segundos, 30 ciclos de 94 °C / 30 segundos, 55 °C / 30 segundos, 72 °C / um minuto e extensão final de 72 °C por sete minutos. O material amplificado foi armazenado a - 20 °C.

3.3.2.3 Reação da polimerase em cadeia ácido desoxirribonucleico do gene *pvl* (Leucocidina *Panton-Valentine*): foi realizada como descrito por Lina *et al.* (1999), utilizando os oligonucleotídeos *luk*S-PV PV1: 5`-ATCATTAGGTAAAATGTCTGGAACATGATCCA-3` e *luk*F-PV PV2: 5`-GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC-3` (Tabela 01), condições da reação: tampão 10×1 (Invitrogem); MgCl2 a 2 mM (Invitrogen); dNTP a 200 µM; 1,5 U AmpliTaq Gold® DNA polimerase, 1 µM de cada primer; 10,7 μL de água Mili-Q estéril; 3 µL de DNA (amostra), utilizamos 3 µL de DNA (amostra). O volume final da reação foi de 25 μL. A amplificação ocorreu nas seguintes condições: 94 °C / dois minutos, 30 ciclos de 94 °C / um minuto + 55 °C / um minuto + 72 °C / um minuto e extensão final de 72 °C / cinco minutos. O material amplificado foi armazenado - 20 °C.

Tabela 01 - Condições para amplificação dos genes *mec*A (resistência aos β-lactâmicos) e *luk*S-PV e *luk*F-PV (Leucocidina *Panton-Valentine*)

Oligonucleotídeo (5´-3´)	Posição no genoma	Genes	Tamanho do fragmento amplificado (pb)	Ciclos	
***mec*A P4** TCCAGATTACAACTTCACCAGG	1990-1211	*mec*A	162 pb	94 °C - 5 min	
				94 °C - 30 seg	30x
				55 °C - 30 seg	
***mec*A P7** CCACTTCATATCTTGTAACG	1351-1332			72 °C - 1 min	
				72 °C - 1 min	
***luk*-PV 1** ATCATTAGGTAAAAATGTCTGGACATGATCCA		*luk*S-PV	433 pb	94 °C - 2 min	
				94 °C - 1 min	30x
				55 °C - 1 min	
***luk*-PV 2** GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC		*luk*F-PV		72 °C - 1 min	
				72 °C - 5 min	

Fonte: Oligonucleotídeos utilizados para amplificação do gene, posição de ligação no genoma bacteriano, amplicons obtidos após a amplificação e ciclos de temperaturas empregados na reação de PCR para detecção do gene *mec*A descritos por Oliveira & Lencastre (2002) e para os genes *luk*S- PV e *luk*F-PV descritos por Lina *et al.* (1999).

3.3.2.4 Eletroforese em gel de agarose a 1,2%: Alíquotas de 10 μL dos amplicons foram aplicadas em gel de agarose 1,2% (*Life Technologies*) em tampão TBE 0,5 x (Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM) e submetidas à eletroforese em mesmo tampão a 100V por aproximadamente uma hora. Foi utilizado padrão de tamanho molecular 100 pb ladder (Invitrogen). O gel foi corado com brometo de etídio 0,5 μg/mL (Invitrogen) por 30 minutos e descorado com água destilada por 90 minutos. Após a eletroforese o gel foi visualizado em luz ultravioleta e a sua imagem capturada por foto documentação digital. (LEE *et al*., 2012)

4.4 INFECÇÃO E SEPSE

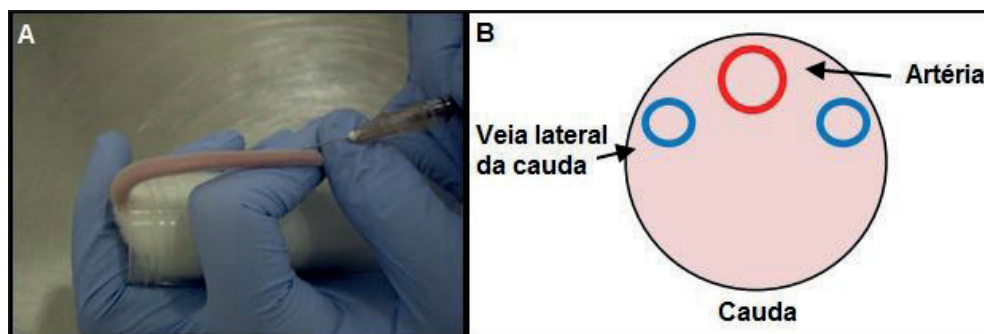
4.4.1 Pesagem dos animais: peso inicial e peso final

Para calcular a variação de peso dos animais, eles foram separados aleatoriamente em cinco grupos contendo cinco animais em cada grupo, suas caudas foram marcadas utilizando caneta piloto, onde o camundongo de número um, recebeu apenas um traço na orientação vertical, o camundongo de número dois recebeu dois traços, e assim sucessivamente. Para que o animal se mantivesse limitado em cima da balança no lugar especifico de pesagem, foi utilizado um recipiente plástico de policarbonato medindo aproximadamente 15 cm de largura, por 15 cm de comprimento e 15 cm de altura. Antes de iniciar a pesagem dos animais, foi aferido o peso do recipiente em balança de precisão (Marte - AD 2000, carga máxima 210 g; sensibilidade de 0,01 g), para que seu valor

fosse subtraído do peso total de cada animal. Um animal de cada vez foi retirado de suas gaiolas, colocado no recipiente e conduzido até a balança, seus valores foram anotados e os animais retornaram para suas gaiolas. Para obtenção dos valores finais dos pesos dos animais, antes de eutanasiá-los ou logo após sua morte causada pela infecção, o mesmo procedimento utilizado na pesagem inicial foi utilizado. Os valores obtidos tanto na pesagem inicial, quanto na pesagem final foram encaminhados para análise estatística.

Após a pesagem os animais foram anestesiados, ao observar a ausência de dor através de sinais como: reflexo da cauda, reflexo palpebral e corneal e alterações das frequências cardíaca e respiratória, que sofrem modificações de acordo com os planos anestésicos atingidos (profundidade da anestesia), (ANDERSEN *et al.*, 2004; NEVES, 2013) a cauda do camundongo foi aquecida com imersão em água morna (40 °C) ocorrendo à dilatação dos vasos, o local de inoculação foi descontaminado com álcool a 70% utilizando uma gaze; através de uma seringa de insulina descartável foi injetada 50 μL de solução salina estéril contendo a estirpe bacteriana em estudo na veia lateral da cauda de cada animal, penetrando 2 mm a 4 mm para o lúmen, mantendo o bisel da agulha com a face para cima, por fim o local foi mantido pressionado com uma gaze evitando o refluxo da solução ou sangue como no exemplo da figura sete.

A suspensão bacteriana foi preparada previamente duas horas antes da inoculação. *S. aureus* em estudo foi semeado em meio TSA 24 horas antes de sua preparação; uma colônia foi isolada para e suspensa em tubo de ensaio estéril de forma asséptica contendo 1000 μL de solução salina estéril (0,9% de NaCl), posteriormente foi feita a diluição em outro tubo de ensaio com solução salina estéril, até obter a da concentração de 10^7 UFC/mL; separamos uma alíquota da suspensão contendo 50 μL (quantidade inoculada), exceto o grupo controle, que foi inoculado soro fisiológico estéril.

Figura 07 - Método de inoculação por via endovenosa

Fonte: Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do biotério de produção e experimentação da FCF-IQ/USP. Imagem A demonstra o modelo de inoculação utilizado para causar bacteremia, injetando diretamente na corrente sanguínea solução contendo cepa em estudo. Imagem B demonstra a localização da veia lateral da cauda. (NEVES, 2013)

4.4.2 Tempo de sobrevida

Para calcularmos o tempo de sobrevida de cada animal, foram anotado o mês, dia, hora e os minutos do momento de inoculação individualmente, foi feito o mesmo com os animais mortos por infecção antes do prazo final para o término do desafio e com os animais eutanasiados após 96 horas (5.760 minutos). Os valores obtidos foram encaminhados para análise estatística.

4.4.3 Pesagem dos órgãos

Após 96 horas (5.760 minutos) foi feita a eutanásia seguindo alguns critérios (Quadro 03) e necropsia dos animais que ainda restaram com vida (Tabela 07) para extração dos órgãos de forma asséptica, tendo em vista que, os animais que não resistiram às 96 horas já foram submetidos à retirada dos órgãos. A eutanásia foi feita através de sobredose anestésica por inalação de Isoflurano FORANE® (2- cloro-2-(difluorometoxi)-1,1,1-trifluoro-etano) em campânula fechada por saturação. Confirmada a morte pela parada cardíaca e respiratória, ausência de reflexos e queda da temperatura corporal < 25 °C. (LIMA *et al.*, 2011)

Após a eutanásia, foi feita a tricotomia do ventre com lâmina cirúrgica e descontaminação da pele com álcool 70%. Com o auxilio de uma tesoura cirúrgica foi feita uma incisão vertical para coleta do coração, baço, rim, pulmão e globo ocular de um dos animais do grupo G4 (MRSA *pvl* +). Os órgãos foram colocados em placa de Petri estéril e com o auxilio de uma pipeta *Pasteur* foram lavados com solução salina estéril (0,9% de NaCl) para retirada de qualquer resíduo de sangue.

Para pesagem dos órgãos, uma nova placa de Petri estéril foi utilizada, porém, antes de darmos início à pesagem dos órgãos, foi aferido o peso da placa de Petri em balança de precisão (Sartorius - BP 221S, capacidade máxima: 220 g; d = 0.1 mg), para que seu valor fosse subtraído ao peso total de cada órgãos. Os órgãos retirados foram individualmente colocados na placa e encaminhados à balança para pesagem, os valores obtidos foram analisados estatisticamente, e relacionados aos valores já mencionados na literatura para camundongos (Tabela 02). (KRINK, 2004; IWAKI *et al.*, 2001)

Tabela 02 - Pesos dos órgãos

Órgãos de camundongos machos	
	Valor absoluto (g)
Coração	0,210
Baço	0,100
Rins	0,640
Pulmão	-

Fonte: Krink, 2004; Iwaki *et al.*, 2001.

4.4.4 Macroscopia dos órgãos

Após aferição dos pesos dos órgãos, os mesmos foram encaminhados a uma bancada anteriormente preparada e descontaminada com álcool 70% para análise macroscópica, os órgãos foram apoiados em uma plataforma de cor azul, onde suas faces foram analisadas de forma comparativa seguindo os seguintes critérios: forma, volume ou tamanho, coloração, presença de lesões e qualquer outra alteração aparente quando comparado com o grupo controle. Cada órgão foi fotografado para montagem e exibição de um quadro comparativo.

Posteriormente os órgãos foram seccionados na orientação vertical a metade, uma parte foi destinada para análise da colonização tecidual e a outra parte destinada ao estudo histopatológico.

4.4.5 Colonização tecidual

Os fragmentos dos tecidos dos órgãos destinados a identificação de colonização foram macerados com o auxílio de um triturador de tecido (*Tissue- Tearor*; *BioSpec Products*, *Inc*. *Model* 985370), adicionando gradualmente solução salina estéril (0,9% de NaCl) até chegar a um volume final de 1,0 mL. O extrato obtido com a maceração foi transferido para um microtubo estéril e homogeneizado no vórtex por um minuto. Após homogeneização foi retirada uma alíquota de 100 μL da suspensão e semeamos em meio ágar sangue Merckoplate® (pH 7,2 a 7,6; armazenado em temperatura 1,7 °C a 3,3 °C) por toda a superfície com alça de Drigalski de forma homogênea. As placas foram incubadas em estufa de crescimento bacteriológico em aerobiose a 36 a 37 °C e examinadas diariamente por até 48 horas. Posteriormente as colônias crescidas foram contadas e as placas fotografadas para montagem e exibição de um quadro comparativo.

4.4.6 Confecção de lâminas histológicas dos tecidos - coração, baço, rim e pulmão

As amostras dos tecidos do coração, baço, rim esquerdo e pulmão esquerdo foram posicionadas em cassetes, armazenadas em formaldeído a 10% com pH entre 0,6 e 0,7 por 48 horas, e encaminhadas ao serviço de anatomia patológica do HUAP, onde foram submetidos às técnicas de rotina para confecção das lâminas. Os cortes foram feitos com 3,0 μm de espessura para a montagem das lâminas, que foram coradas em hematoxilina eosina. Após o processo de confecção das lâminas, as mesmas foram observadas em microscópio óptico (modelo LX 500) e fotografadas utilizando uma câmera iVm 5000 através do programa ProgRes capture Pro 2.7 para a descrição histopatológica.

4.5 FORMAÇÃO DE BIOFILME

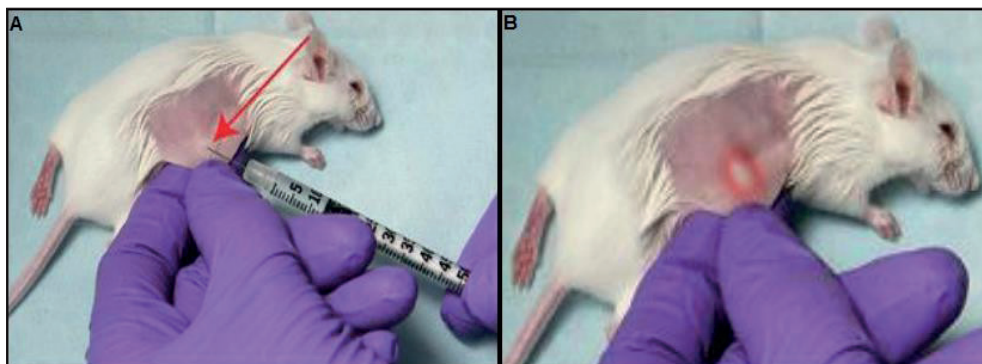
4.5.1 Pesagem dos animais: peso inicial e peso final

Para calcularmos a variação de peso dos animais utilizamos a mesma metodologia empregada no item 4.4.1.

4.5.2 Método cirúrgico de inserção de fragmento de cateter em dorso de camundongos

Os animais foram anestesiados com Isoflurano FORANE® (2-cloro-2-(difluorometoxi)-1,1,1-trifluoro-etano), por inalação em campanula fechada, após a observação de ausência de reflexos à dor foi feito a tricotomia com lâmina cirúrgica da área dorsolateral do pescoço dos camundongos, região onde foi feita a cirurgia, a região foi descontaminada com álcool a 70%. Através de uma incisão foi feita uma bolsa subcutânea medindo aproximadamente 1,5 cm. Um fragmento de cateter (Becton Dickinson - Arentina S.R.L) medindo 0,5 cm estéril (embalado individualmente e autoclavado) foi introduzido na bolsa de forma asséptica. (ARCHER *et al.*, 2011; ATAHAN *et al.*, 2009) A incisão foi fechada com cola cirúrgica sintética Glubran® 2 (GEM S.r. I – Itália).

Para a inoculação da suspensão bacteriana o animal foi contido manualmente, apoiado sobre uma superfície descontaminada, a agulha foi inserida sob a pele solta, apreendida com o polegar e o indicador, e, em seguida, injetada a substância contendo a bactéria em estudo com distância de um centímetro do local onde foi inserido o fragmento de cateter, utilizando seringa de insulina descartável, método que raramente é doloroso. A administração intradérmica possui a velocidade de absorção inferior as vias intraperitoneal e intramuscular como no exemplo da figura oito. (DIEHL *et al.*, 2001; NEVES, 2013) Cada seringa continha 50 μL da suspensão bacteriana preparada uma hora antes da inoculação. Os isolados de *S. aureus* em estudo foram semeados em meio TSA (*trypticase soy ágar*) 24 horas antes de sua preparação e as colônias desenvolvidas foram coletadas e ressuspensas em solução salina estéril (0,9% de NaCl) em tubo de ensaio estéril. A concentração foi definida por diluição seriada e contagem de unidades formadoras de colônias em meio ágar sangue, de acordo com protocolo previamente definido. (KIEDROWSK *et al.*, 2011) A diluição teve seu prosseguimento em outro tubo de ensaio com solução salina estéril, até obter a concentração de 10^7 UFC/mL Uma alíquota da suspensão com 50 μL foi inoculada, exceto o grupo controle, que continha apenas solução salina estéril.

Figura 08 - Método de inoculação por via intradérmica

Fonte: Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do biotério de produção e experimentação da FCF-IQ/USP. Imagem A e B demonstram o modelo de inoculação intradérmica. (NEVES, 2013)

4.5.3 Macroscopia do dorso dos camundongos

Após 96 horas (5.760 minutos) do desafio o peso final dos animais foi aferido, como já descrito anteriormente no item 3.4.1. Os animais forma eutanasiados seguindo os critérios descritos no quadro três, a eutanásia foi feita através de sobredose anestésica por inalação de Isoflurano FORANE® (2-cloro-2- (difluorometoxi)-1,1,1-trifluoro-etano) em campânula fechada por saturação. Confirmada a morte pela parada cardíaca e respiratória, ausência de reflexos e queda da temperatura corporal < 25 °C, (LIMA *et al.*, 2011) os animais foram encaminhados a uma bancada anteriormente preparada e descontaminada com álcool 70% para análise macroscópica do dorso, os mesmos foram apoiados em uma plataforma de cor azul, com suas regiões dorsais voltadas para cima. Os dorsos foram analisados de forma comparativa utilizando como padrão o grupo controle, buscando a presença de alterações morfológicas compatíveis com infecção, como: edema, hiperemia necrose e exsudato. Cada região onde foi inserido o fragmento de cateter foi fotografada para montagem de um quadro comparativo.

4.5.4 Macroscopia do fragmento de cateter

Os fragmentos de cateter foram explantados do dorso dos camundongos através de uma incisão feita no mesmo local onde foi executada para a inserção. Com o auxilio da ponta de uma pinça cirúrgica estéril os fragmentos foram retirados preservando todo o material que os circundava. Os mesmos foram encaminhados para uma bancada anteriormente preparada e descontaminada com álcool 70% para análise macroscópica. Na análise, foi observada se havia a presença de material aderido à superfície interna e externa do cateter e o aspecto: se a consistência era líquida ou espessa, se a cor do material apresentava transparência ou opacidade. Os cateteres explantados foram fotografados para montagem de um quadro comparativo.

4.5.5 Colonização e formação de biofilme em cateter

Os cateteres explantados foram colocados separadamente em tubos de ensaio com capacidade 10 mL para cultura quantitativa. Este método consiste na lavagem da superfície externa e interna utilizando 1,0 mL de solução salina estéril (0,9% de NaCl), através da agitação em vórtex por um minuto. Da diluição, uma alíquota de um décimo (100 µL) foi retirada com uma pipeta automática e transferida para uma placa de Petri (90 x 15 mm), contendo 25,0 mL de ágar sangue de carneiro a 5,0%. A semeadura foi realizada sobre toda a superfície do meio de cultura de forma homogênea com auxilio de uma alça de Drigalski. Em seguida foi incubada em estufa bacteriológica em aerobiose, a 36 a 37 °C e examinada diariamente por até 48 horas. A contagem das unidades formadoras de colônias foi correlacionada com a diluição inicial (um décimo). O resultado da cultura quantitativa foi relatado como UFC/mL (unidades formadoras de colônias por mL) e o crescimento ≥ 10^3 (≥ 1000 colônias) UFC/mL confirma colonização do cateter. (ATAHAN *et al.*, 2009; SCHECHTER & MARANGONI, 1998)

4.5.6 Confecção de lâminas histológicas do tecido dorsal

Para a confecção das lâminas histológicas foi extraído um fragmento de pele do dorso que revestia o cateter, medindo aproximadamente 1 cm largura por 1 cm de comprimento. Os fragmentos foram posicionados em cassetes, armazenados em formaldeído a 10% com pH entre 0,6 e 0,7 por 48 horas, e encaminhados ao serviço de anatomia patológica do HUAP, onde foram submetidos as técnicas de rotina para a confecção das lâminas. Os cortes foram feitos com 3,0 *µ*m de espessura para a montagem das lâminas, que foram coradas em hematoxilina eosina. Após o processo de confecção das lâminas, as mesmas foram observadas em microscópio óptico (modelo LX 500) e fotografadas utilizando uma câmera iVm 5000 através do programa ProgRes capture Pro 2.7 para a descrição histopatológica.

Quadro 03 - Critérios utilizados como método humanitário de eutanásia

Critérios
Ausência de sinais de medo, dor ou de estresse.
Período de tempo mínimo para que o animal fique inconsciente.
Método confiável e passível de reprodução.
Método seguro para a pessoa que o executa.
Deve causar o mínimo de efeitos psicológicos e fisiológicos ao animal.
Deve ser compatível com as necessidades da pesquisa.
Não deve causar efeitos emocionais ao operador, ou causar o mínimo de efeitos.
Deve trazer o mínimo de impacto sobre o meio ambiente.
A manutenção dos equipamentos utilizados deve ser fácil e periódica.
Deve ser realizado longe das salas de animais.
O operador deve ser experiente na correta contenção e no manejo dos animais.

Fonte: Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do biotério de produção e experimentação da FCF-IQ/USP. As técnicas devem resultar na perda de consciência de forma rápida, seguida por parada cardíaca ou respiratória e pela perda definitiva da função cerebral. (NEVES, 2013)

ESTATÍSTICA

5.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO EXPERIMENTO DE INFECÇÃO E SEPSE

Foi realizada Análise da Variância para sete fatores. Utilizando como variável de interesse a relação entre peso inicial e o final dos animais de cada grupo através do teste de comparação múltipla Kruskal-Wallis; para a variável de peso dos órgãos: coração e rim foi utilizado o teste de comparação múltipla Shapiro-Wilk, e para o baço e pulmão foi utilizado o teste de comparação múltipla Kruskal-Wallis, após o desafio utilizando como padrão de normalidade o grupo controle. Para a variável de tempo de sobrevida após o desafio no prazo de 96 horas (5.760 minutos) de observação foi utilizado o teste de comparação múltipla log rank; para a variável em quantificação de colônias nos extratos obtidos com a maceração da metade dos tecidos dos órgãos foi utilizado o teste de comparação múltipla através do gráfico em coluna. O software utilizado foi o SPSS versão 10.0, tendo como resultado estatístico ao nível de significância $\alpha = 0,05$.

5.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO EXPERIMENTO DE BIOFILME

Foi realizada Análise da Variância para dois fatores. Utilizando como variável de interesse a relação entre peso inicial e o final dos animais de cada grupo foi utilizado o teste de comparação múltipla Kruskal-Wallis; para a variável em quantificação de colônias nos extratos obtidos a partir dos cateteres explantados após o desafio no prazo de 96 horas (5.760 minutos) de observação foi utilizado o teste de comparação múltipla utilizando gráfico em coluna. O software utilizado para a variável de peso inicial e final foi o SPSS versão 10.0, tendo como resultado estatístico ao nível de significância $\alpha = 0,05$.

RESULTADOS

Após a fenotipagem e genotipagem das amostras bacterianas foi constatada a adequabilidade das cepas para uso dos experimentos. As amostras inoculadas foram identificadas através da caracterização fenotípica conforme descrito no item 3.3.1. Por estarmos estudando amostras com diferentes perfis gênicos, a genotipagem das amostras foi feita para identificar se as cepas portavam os genes *mec*A e *pvl* através da PCR (*Polymerase Chain Reation*) convencional conforme descrito nos itens 3.3.2.2 e 3.3.2.3.

6.1 INFECÇÃO E SEPSE

6.1.1 Peso dos animais: peso inicial e peso final

A avaliação do peso inicial nos grupos estudados, comparados com o grupo controle G1 (35,70 g ± 0,55 g), os demais grupos G2 (36,36 g ± 2,33 g), G3 (33,09 g ± 2,18 g), G4 (32,43 g ± 0,77 g) e G5 (32,53 g ± 2,48 g), não apresentaram diferença estatisticamente significativa ao nível de significância α = 0,05, conforme apresentado na tabela 03.

Tabela 03 - Peso inicial dos animais (g)

Grupos	N	Média	d.p. (*)
G1: Controle	5	35,700 g	0,5568
G2: MSSA *pvl* (-)	5	36,367 g	2,3311
G3: MSSA *pvl* (+)	5	33,090 g	2,1898
G4: MRSA *pvl* (+)	5	32,430 g	0,7778
G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT	5	32,535 g	2,4819

(*) d.p.: desvio padrão; a.i.q.: amplitude interquartílica

Assim como nos pesos iniciais, ao compararmos os resultados encontrados nos grupos G2 (34,50 g ± 1,63 g), G3 (29,19 g ± 1,90 g), G4 (30,79 g ± 1,06 g) e G5 (30,52 g ± 1,13 g), com o grupo controle G1 (31,49 g ± 1,31 g), não foram observadas, ao nível de significância α = 0,05, diferença estatística significativa entre os grupos em relação ao peso final dos animais (Tabela 04).

Tabela 04 - Peso final dos animais (g)

Grupos	N	Média	d.p. (*)
G1: Controle	5	31,497 g	1,3169
G2: MSSA *pvl* (-)	5	34,503 g	1,6323
G3: MSSA *pvl* (+)	5	29,197 g	1,9037
G4: MRSA *pvl* (+)	5	30,790 g	1,0607
G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT	5	30,520 g	1,1314

(*) d.p.: desvio padrão; a.i.q.: amplitude interquartílica

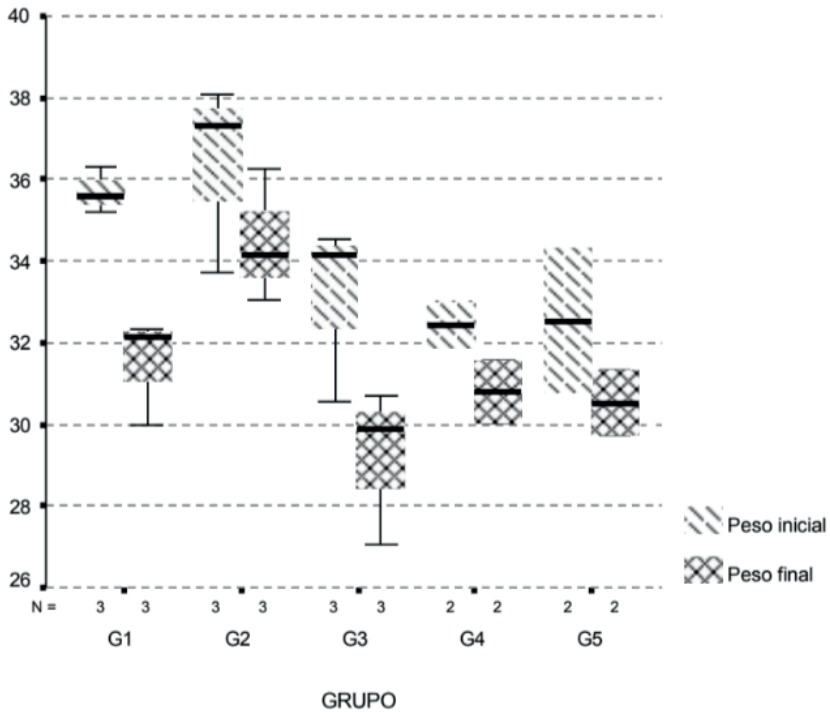
6.1.2 Análise comparativa da diferença entre o peso final e o peso inicial

Na comparação entre a relação do peso final e peso inicial no nível de significância a = 0,05, foi observado a inexistência de diferença entre a perda de peso nos grupos estudados, pesos dos grupos: G1 (0,20 g ± 1,83 g); G2 (1,86 g ± 1,26 g); G3 (3,89 g ± 3,20 g); G4 (1,64 g ± 0,28 g) e G5 (2,01 g ± 1,35 g) (Tabela 05 - Gráfico 01).

Tabela 05 - Diferença entre o peso final e o inicial

Grupos	N	Média	d.p. (*)
G1: Controle	5	0,203 g	1,8361
G2: MSSA *pvl* (-)	5	1,863 g	1,2616
G3: MSSA *pvl* (+)	5	3,893 g	3,2052
G4: MRSA *pvl* (+)	5	1,640 g	0,2828
G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT	5	2,015 g	1,3506

(*) d.p.: desvio padrão; a.i.q.: amplitude interquartílica

Gráfico 01 - Diagrama conjugado dos pesos iniciais e finais

6.1.3 Tempo de sobrevida após infecção

A análise do tempo de sobrevida dos animais de todos os grupos estudados indicou inexistência de diferença significativa entre os tempos de sobrevivência, mesmo quando comprados com o grupo controle, ao nível de significância a = 0,05. Porém foi observada nos grupos G2: MSSA *pvl* (-), G3: MSSA *pvl* (+) e G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT, a sobrevivência de 60% dos animais em cada grupo, o que corresponde a dois animais mortos antes do desafio de 96 horas (5.760 minutos), no grupo G4: MRSA *pvl* (+) foi observado 80% de sobrevivência, correspondendo a um animal morto antes do prazo para término do desafio. Já no grupo controle, todos os animais se mantiveram com vida até o prazo final do estudo, cinco animais com vida (Tabela 06).

Tabela 06 - Descrição comparativa entre os tempos de sobrevida após desafio de 96 horas (5.760 minutos) de infecção

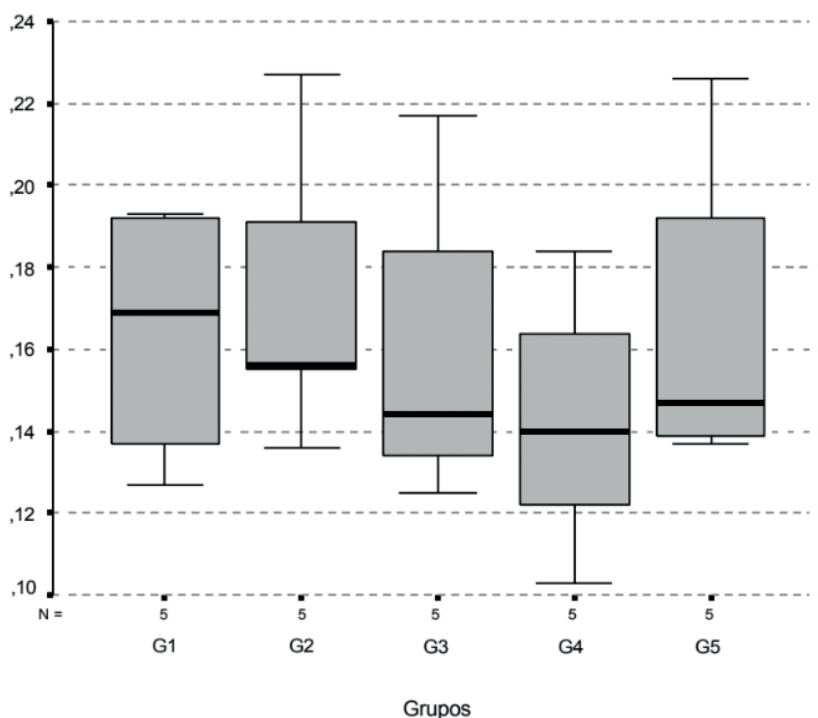
Grupo	Número de óbitos	Número de tempos censurados (sobreviventes)	Percentual de sobreviventes	Tempo médio de sobrevida (minutos)	Erro padrão do tempo de sobrevida	I.C.95% Tempo de sobrevida	
						Mínimo	Máximo
G1: Controle	0	5	100%	5760	0	-	-
G2: MSSA *pvl* (-)	2	3	60%	5075	435	4222	5928
G3: MSSA *pvl* (+)	2	3	60%	4744	557	3653	5835
G4: MRSA *pvl* (+)	1	4	80%	5555	184	5195	5915
G5: MRSA pvl (+) USA300 WT	2	3	60%	4172	964	2282	6061
Todos	7	18	72%	5061	273	321	5760

I.C.95%: Intervalo de confiança a 95% de confiança.

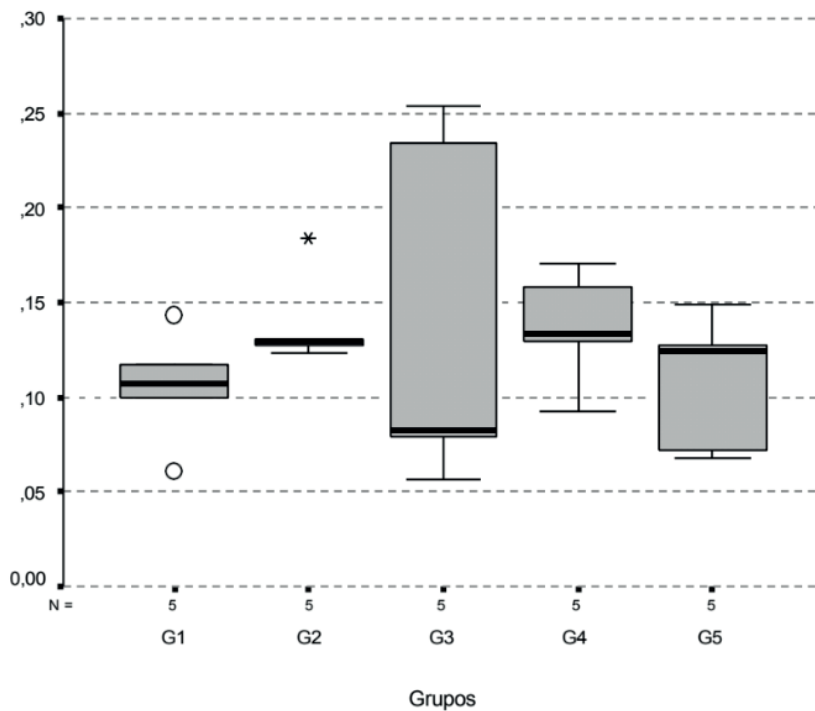
6.1.4 Peso dos órgãos

6.1.4.1 Pesos dos corações

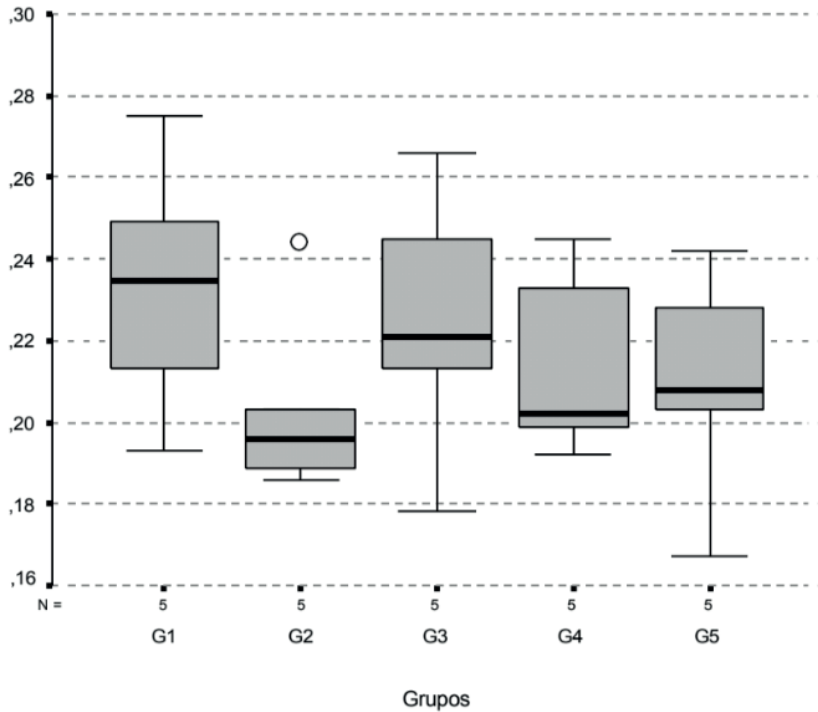
A análise da variância, ao nível de significância a = 0,05 para cada um dos grupos G2: MSSA *pvl* (-) (0,173 g ± 0,001 g), G3: MSSA *pvl* (+) (0,161 g ± 0,038 g), G4: MRSA *pvl* (+) (0,143 g ± 0,032 g) e G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT (0,168 g ± 0,039 g) não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle G1: controle (0,164 g ± 0,030 g). Mais ainda, nenhum dos grupos difere de qualquer outro com relação ao peso do coração (Gráfico 02).

Gráfico 02 - Descrição gráfica comparativa dos pesos dos corações nos diferentes grupos

6.1.4.2 Pesos dos baços

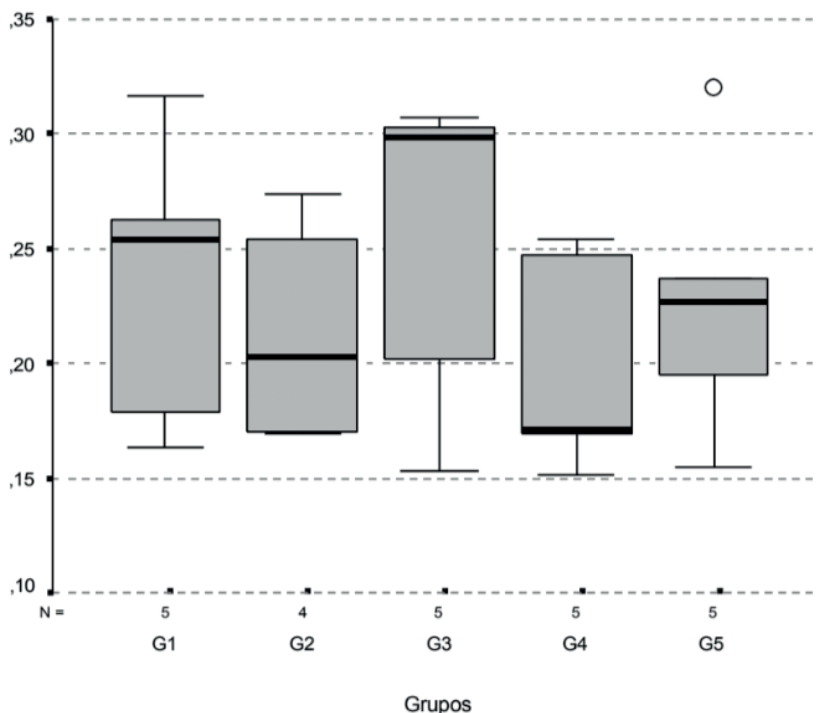
A análise da variância, ao nível de significância a = 0,05 para cada um dos grupos G2: MSSA *pvl* (-) (0,139 g ± 0,0255 g), G3: MSSA *pvl* (+) (0,141 g ± 0,094 g), G4: MRSA *pvl* (+) (0,137 g ± 0,030 g) e G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT (0,108 g ± 0,036 g) não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle G1: controle (0,106 g ± 0,029 g). Mais ainda, nenhum dos grupos difere de qualquer outro com relação ao peso dos baços (Gráfico 03).

Gráfico 03 - Descrição gráfica comparativa dos pesos dos baços nos diferentes grupos

6.1.4.3 Peso dos rins

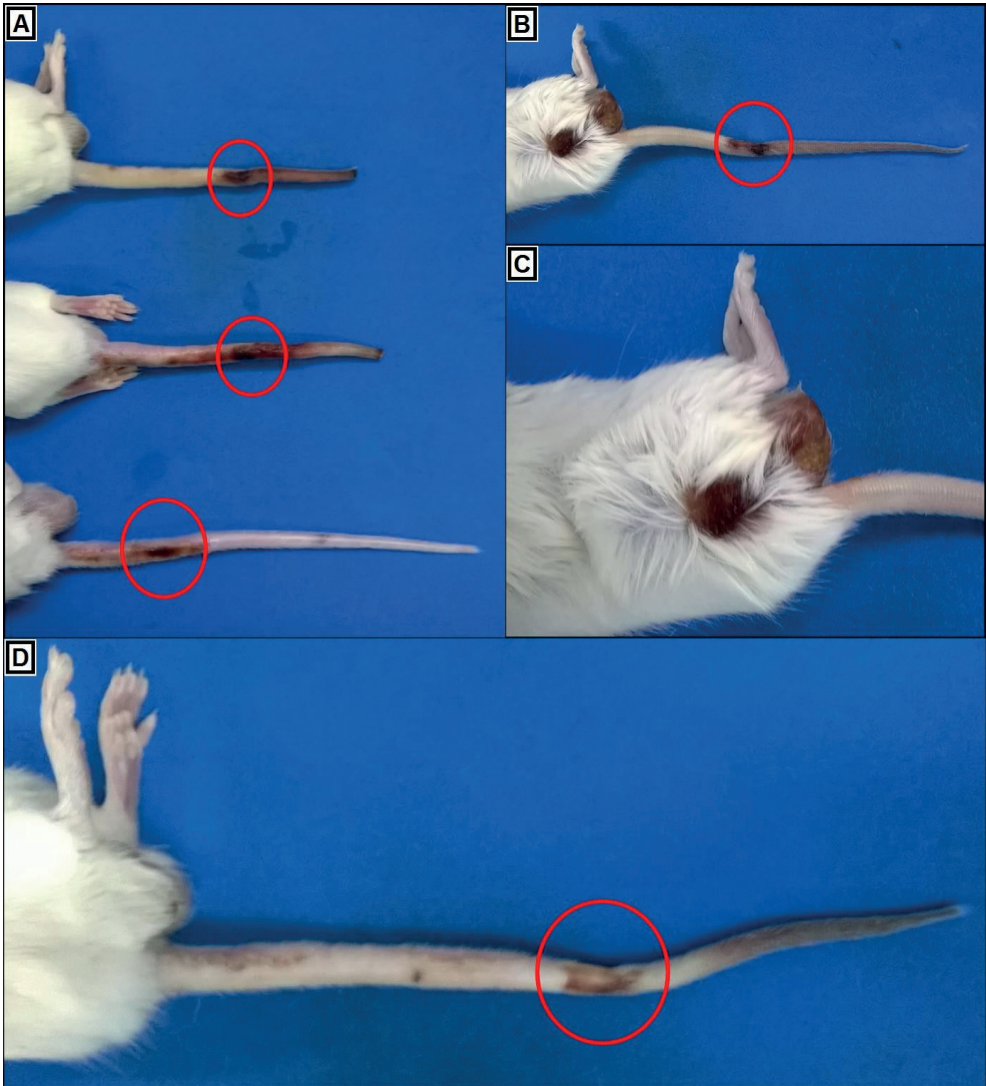
A análise da variância, ao nível de significância a = 0,05 para cada um dos grupos G2: MSSA *pvl* (-) (0,204 g ± 0,0235 g), G3: MSSA *pvl* (+) (0,225 g ± 0,0334 g), G4: MRSA *pvl* (+) (0,214 g ± 0,0233 g) e G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT (0,210 g ± 0,0285 g) não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle G1: controle (0,233 g ± 0,0317 g). Mais ainda, nenhum dos grupos difere de qualquer outro com relação ao peso dos rins (Gráfico 04).

Gráfico 04 - Descrição gráfica comparativa dos pesos dos rins nos diferentes grupos

6.1.4.4 Pesos dos pulmões

A análise da variância, ao nível de significância a = 0,05 para cada um dos grupos G2: MSSA *pvl* (-) (0,212 g ± 0,0513 g), G3: MSSA *pvl* (+) (0,253 g ± 0,0709 g), G4: MRSA *pvl* (+) (0,198 g ± 0,0483 g) e G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT (0,227 g ± 0,0611 g) não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle G1: controle (0,235 g ± 0,0636 g). Mais ainda, nenhum dos grupos difere de qualquer outro com relação ao peso dos pulmões (Gráfico 05).

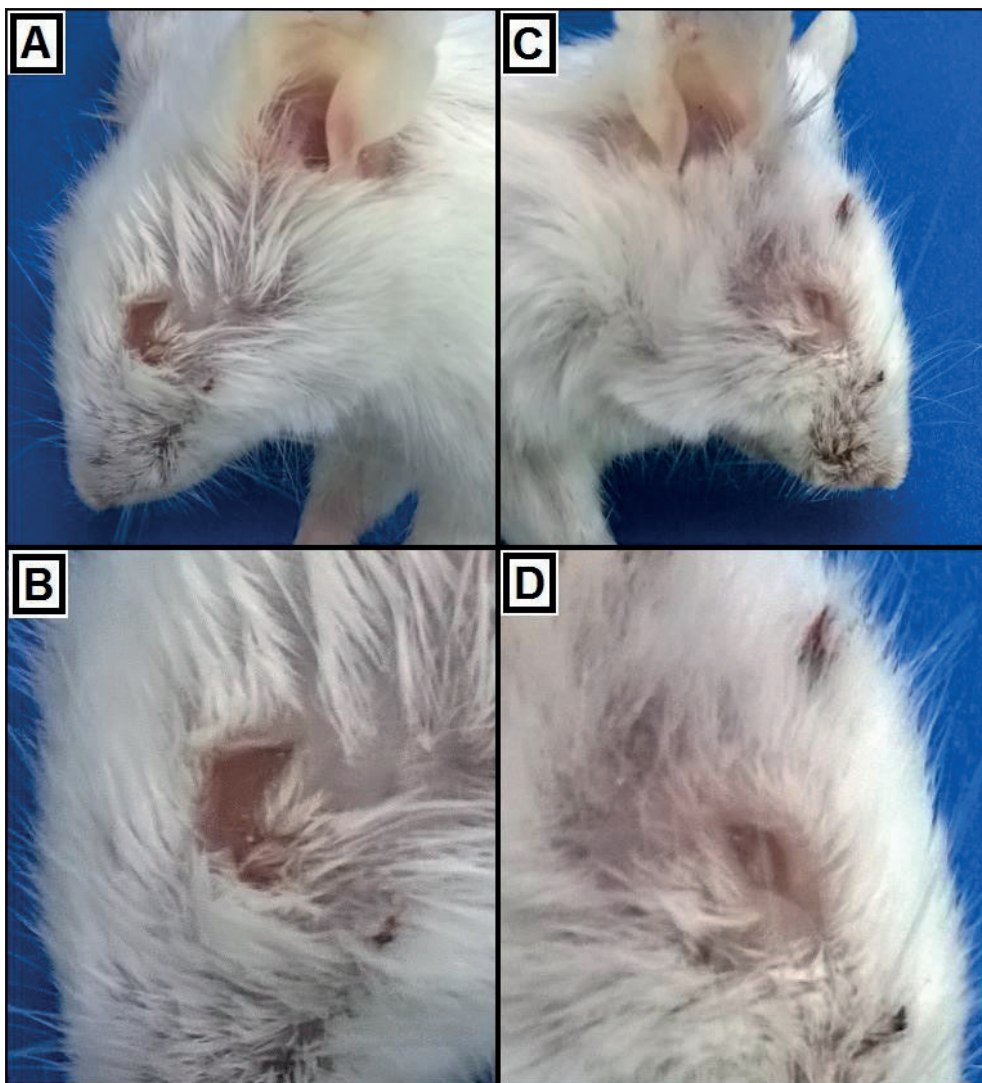
Gráfico 05 - Descrição gráfica comparativa dos pesos dos pulmões nos diferentes grupos

6.1.5 Análise macroscópica da cauda

Em alguns dos animais foram observadas alterações nos locais de inoculação. Na cauda de três animais pertencentes ao grupo G2: MSSA *pvl* (-) foi constatada a presença de ulceração com hiperemia, a região distal apresentou perda da extremidade por necrose, na região proximal exibiu espessamento por edema e palidez (Figura 09 - Imagem A). No grupo G3: MSSA *pvl* (+) também foi observada ulceração com hiperemia que se estendia até a extremidade, a região proximal da cauda apresentou espessamento por edema e palidez, ainda foi observado uma região circular com perda de pelos e hiperemia na pata posterior direita. O testículo do mesmo animal exibiu edema e hiperemia (Figura 09 - Imagem B e C). Assim como foi observada também no grupo G4: MRSA *pvl* (+), ulceração no local de inoculação com hiperemia e coloração vinhosa que se estende até a extremidade possivelmente acometida por necrose, a região próxima a base da cauda exibiu espessamento e edema (Figura 09 - Imagem D). Nos demais grupos G1 (solução salina a 0,9% de NaCl) e G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT não foram observados qualquer alteração nos locais de inoculação.

Figura 09 - Caudas de camundongos com infecção, lesão em pele e testículos

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF. Na imagem A, caudas com ulceração e hiperemia apresentando coloração vinhosa, região distal com necrose e perda das extremidades, as regiões próximas as bases com espessamento por edema e palidez. Na imagem B, a cauda apresenta ulceração com hiperemia e zona vinhosa que se estende até a extremidade possivelmente acometida por necrose, imagem C (150x) a cauda na região próxima a base com espessamento e edema, área próxima ao local de inoculação apresentou perda de pelos e coloração vinhosa. O testículo apresentou edema e hiperemia. Imagem D, a cauda apresentou ulceração com hiperemia e zona vinhosa que se estende até a extremidade possivelmente acometida por necrose, região próxima a base da cauda exibiu espessamento e edema.

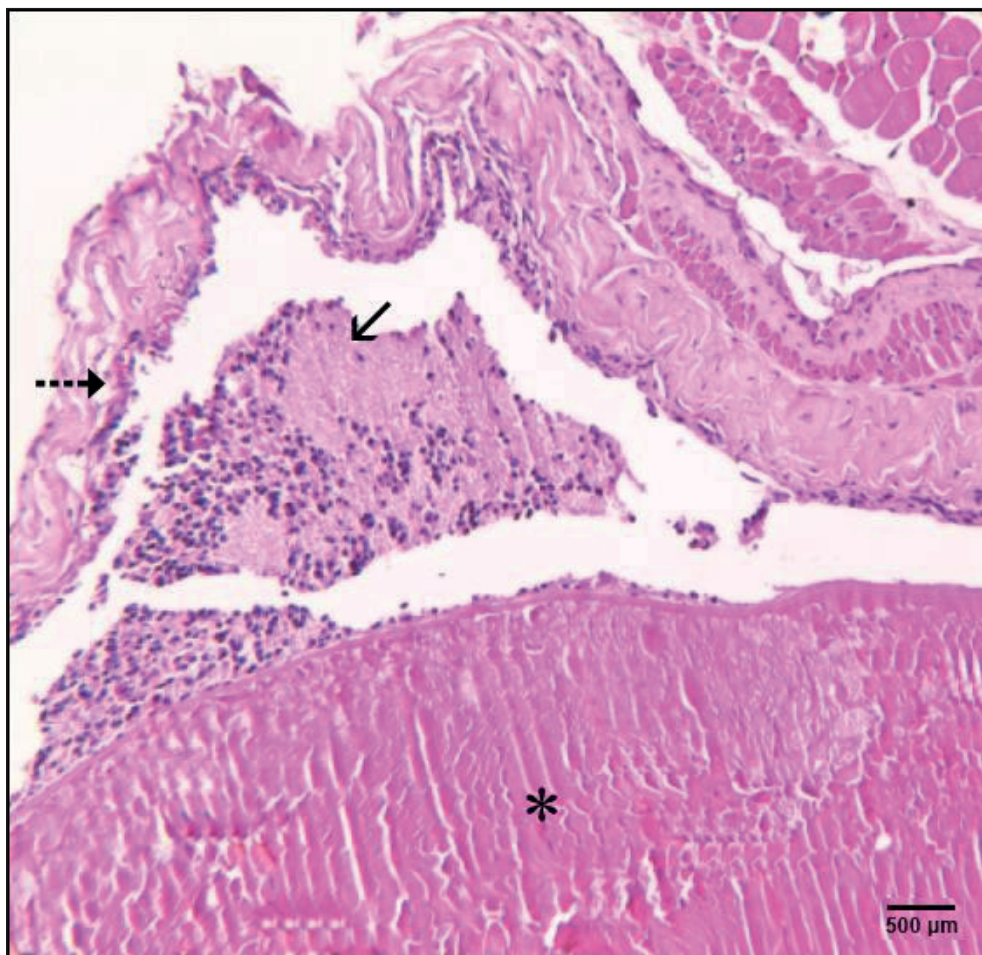
6.1.6 Análise macroscópica dos olhos

Foi observado em apenas um dos animais pertencente ao grupo G4: MRSA *pvl* (+) em ambos os globos oculares (direito e esquerdo) apresentando infecção, composta por material purulento espesso e amarelado cobrindo as escleras, e edema palpebral (Figura 10).

Figura 10 - Globos oculares direito e esquerdo com infecção

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF. Ambos os globos oculares, direito (imagem A e B no aumento de 150x) e esquerdo (imagem C e D no aumento de 150x) apresentando material espesso e amarelado revestindo as escleras, edema palpebral e perda de pelos no local, orelha com vermelhidão e perda das bordas.

6.1.7 Análise histopatológica do globo ocular

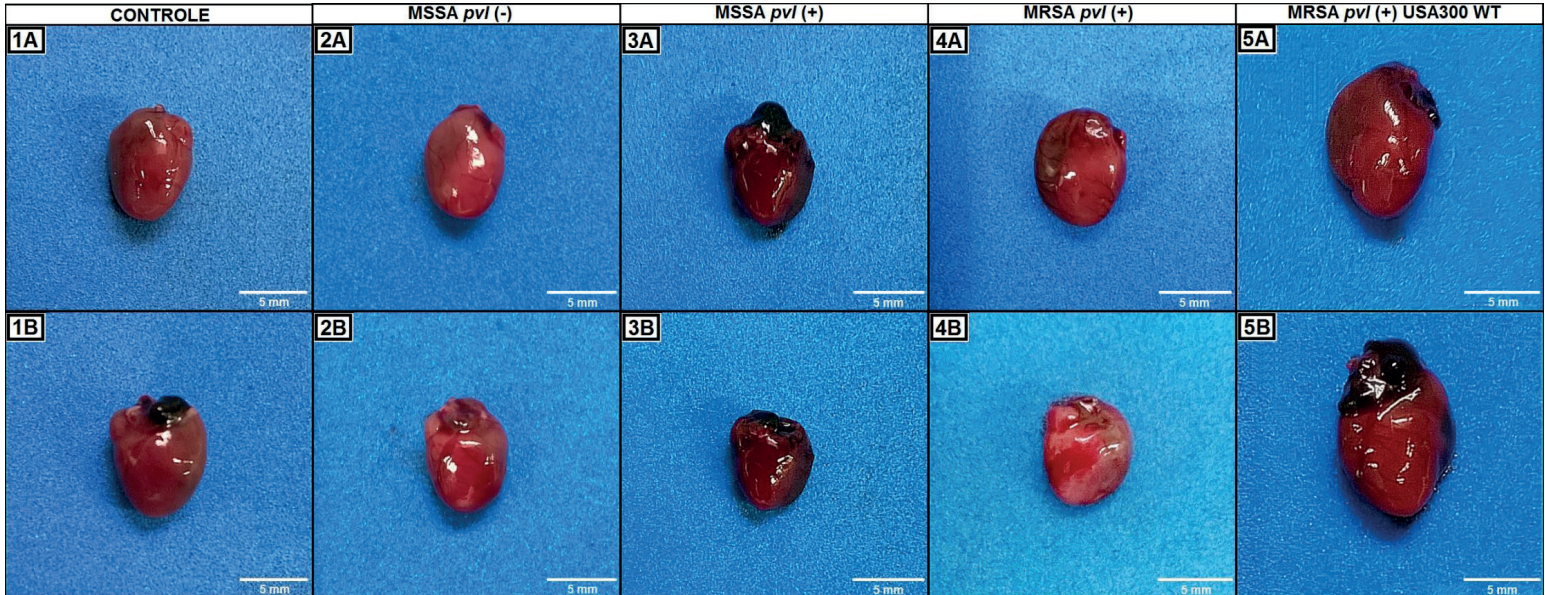
No grupo G4: MRSA *pvl* (+), foi constatada alteração no globo ocular em um dos animais, a análise histopatológica exibiu exsudato inflamatório composto por fibrina com fragmento do mesmo aderido à esclera, ainda restos celulares de necrose no epitélio em algumas áreas com a invasão leucocitária (Figura 11).

Figura 11 - Microscopia do olho explantado após 79 horas e 30 minutos, referente ao camundongo do grupo G4, corada em HE

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF. Imagem (100x) globo ocular (asterisco), exsudato inflamatório composto por leucócito polimorfonuclear e fibrina (seta), epitélio com área de necrose com invasão leucocitária (seta pontilhada).

6.1.8 Análise macroscópica dos corações

Algumas imagens referentes à análise macroscópica dos órgãos podem apresentar diferenças em relação ao tamanho, mostrando desiguais proporções entre a face anterior e posterior, essas diferenças se devem ao ângulo utilizado para captação de luminosidade do ambiente e a distância entre o órgão e a câmera fotográfica.

Na avaliação do coração do grupo G1 (solução salina a 0,9% de NaCl), foi observado que o mesmo apresentou forma e volume preservados, coloração avermelhada (Figura 12 - Imagem 1A). O ápice apresenta um coágulo (Figura 12 - Imagem 1B). No grupo G2: MSSA *pvl* (-) o coração apresentou forma preservada e volume ligeiramente aumentado quando comparado com o grupo controle G1, a região direita compreendida entre o átrio e ventrículo apresentou uma coloração avermelhada (Figura 12 - Imagem 2A). O grupo G3: MSSA *pvl* (+) o coração apresentou coloração mais escurecida, o ápice enegrecido (Figura 12 - Imagem 3A), o restante do órgão apresentou coloração violácea que se estendeu por todo restante do tecido, não houve alteração em sua forma, porém apresentou diminuição no volume quando comparado com o grupo controle G1. No grupo G4: MRSA *pvl* (+) o coração apresentou globoso com volume aumentado, quando comparado com o grupo controle G1, a coloração de vermelha a vinhosa em toda a face anterior (Figura 12 - Imagem 4A), a face posterior apresentou coloração pálida com regiões avermelhadas (Figura 12 - Imagem 4B). O grupo G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT, o coração apresentou a forma preservada e volume aumentado, o ápice (átrio direito) com uma região de cor enegrecida (Figura 12 - Imagem 5B) que se estendia no interior do órgão até o ventrículo direito (Figura 12 - Imagem 5A).

Figura 12 - Macroscopia da face anterior e posterior dos corações

CONTROLE | MSSA *pvl* (-) | MSSA *pvl* (+) | MRSA *pvl* (+) | MRSA *pvl* (+) USA300 WT

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF.

6.1.9 Análise histopatológica dos corações

Na análise histopatológica dos corações do grupo G1 (solução salina a 0,9% de NaCl), foi observado que o tecido cardíaco manteve sua disposição habitual sem afastamento de fibras, que se mantiveram em feixes paralelos, os núcleos bem situados no centro das células com a cromatina compacta. (Figura 13 - Imagem A e B). No grupo G2: MSSA *pvl* (-) o tecido cardíaco exibiu a presença de massas bacterianas em tamanhos variáveis (grânulos basofílicos) e células inflamatórias entre as fibras musculares. Algumas regiões foram observadas a dissociação das fibras devido ao edema, efluxo inflamatório e necrose (Figura 14 - Imagem A e B). O grupo G3: MSSA *pvl* (+) revelou a presença de áreas com edema e aumento de células inflamatórias permeando as fibras musculares, foram observadas múltiplas massas basofílicas em regiões variáveis (sugestiva de colônias bacterianas), ao redor delas as fibras musculares apresentaram perda de seus limites por necrose. Ainda a presença de colônia bacteriana no interior do vaso ocasionando congestão (Figura 15 - Imagem A e B). No grupo G4: MRSA *pvl* (+), o tecido cardíaco exibiu desorganização das fibras musculares e presença de massas eosinofílicas, células inflamatórias no espaço inter-fibrilar, ainda discreta vacualização de fibras, foi observado também vasos congestos (Figura 16 - Imagem A e B). Na análise histopatológica dos corações do grupo G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT foi observado no tecido cardíaco alguns núcleos apresentando cariólise. Presença de colônias bacterianas com necrose extensa por todo o tecido, ao redor das colônias a região se apresentou mais eosinofílica com necrose isquêmica, poucos linfócitos presentes (Figura 17 - Imagem A e B).

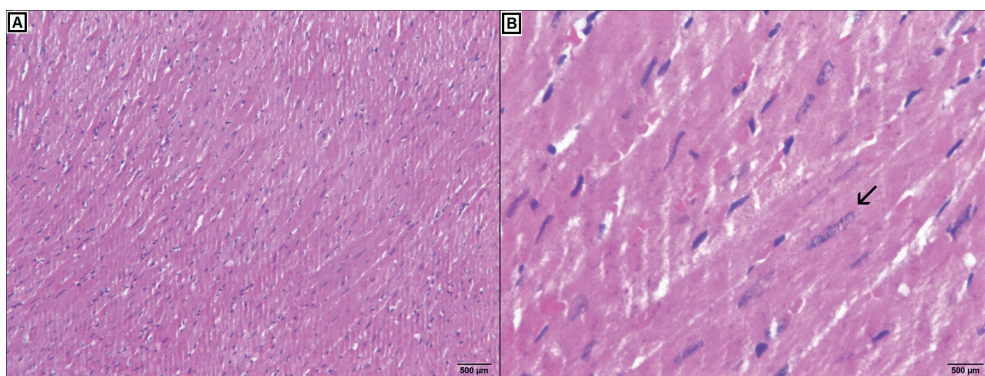
Figura 13 - Microscopia do coração explantado após 96 horas do grupo G1 (controle - inoculado com solução salina estéril a 0,9% de NaCl) e corado em HE

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF. Imagem A (100x) fibras organizadas, não há fragmentação, com disposição habitual. Imagem B (400x) presença de espaçamento entre as fibras decorrente de artefacto, miocardiócito com núcleo bem situado e cromatina compacta (seta).

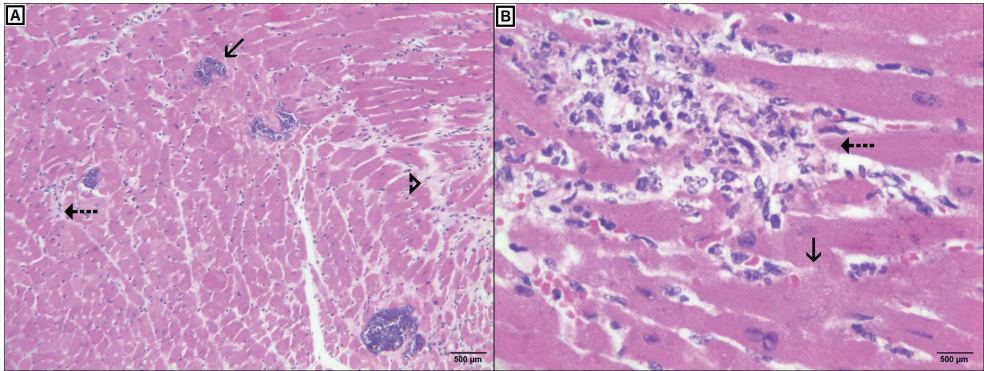
Figura 14 - Microscopia do coração explantado após 54 horas e 46 minutos do grupo G2: MSSA *pvl* (-) e corado em HE

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF. Imagem A (100x) massas bacterianas em tamanhos variáveis (seta), células inflamatórias entre as fibras musculares (seta pontilhada), dissociação das fibras musculares por edema e efluxo inflamatório (ponta de seta vasada). Imagem B (400x) extensa região de necrose com edema (seta), grande região de afluxo inflamatório misto composto por neutrófilos e monócitos com restos nucleares (seta pontilhada).

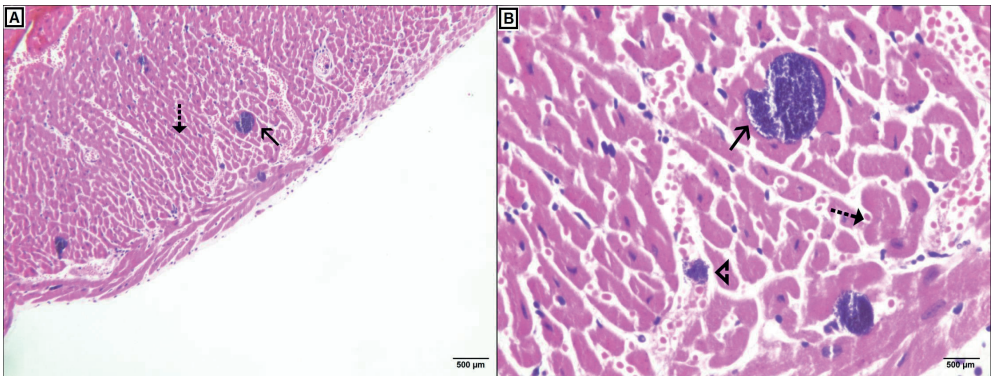
Figura 15 - Microscopia do coração explantado após 53 horas e 18 minutos do grupo G3: MSSA *pvl* (+) e corado em HE

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF. Imagem A (100x) área de edema com presença de células inflamatórias permeando as fibras musculares (seta pontilhada), colônia bacteriana (seta). Imagem B (400x) perda dos limitas das fibras por necrose com presença de células inflamatórias (seta pontilhada), massas basofilicas múltiplas em regiões variáveis sugestivo de colônia bacteriana (seta), capilar congesto com colônia bacteriana (seta vazada).

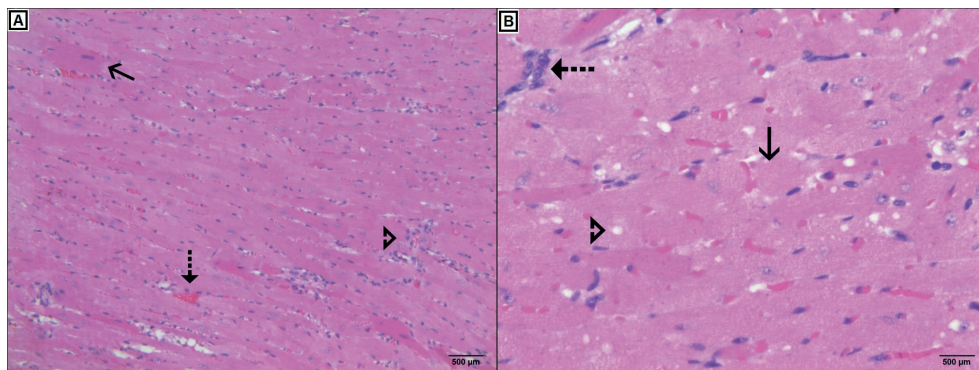
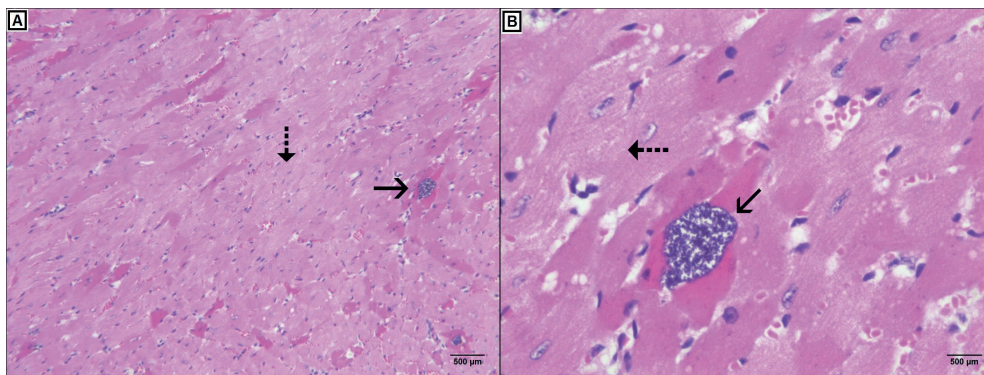
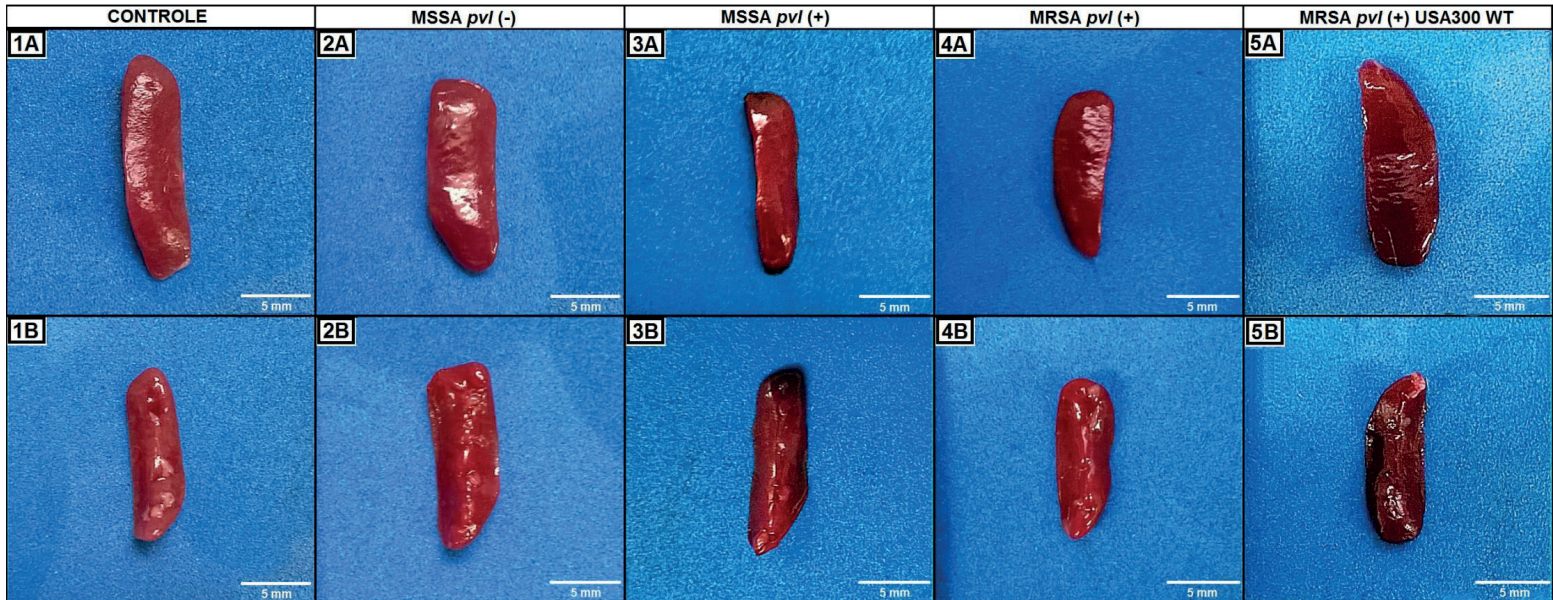
Figura 16 - Microscopia do coração explantado após 78 horas e nove minutos do grupo G4: MRSA *pvl* (+) e corado em HE

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF. Imagem A (100x) desorganização das fibras musculares com massas eosinofílicas (seta), vaso congesto (seta pontilhada), células inflamatórias no espaço inter-fibrilar muscular (seta vazada). Imagem B (400x) tecido apresentando desorganização por necrose (seta), células inflamatórias (seta pontilhada) e discreta vacualização das fibras (seta vazada).

Figura 17 - Microscopia do coração explantado após cinco horas e 35 minutos do grupo G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT e corado em HE

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF. Imagem A (100x) colônia bacteriana com coloração eosinofílica ao redor (seta) tecido amorfo com necrose isquêmica (seta pontilhada). Imagem B (400x) colônia bacteriana com região ao redor mais eosinofílica caracteristica de necrose isquêmica (seta), necrose com espessamento de fibras com poucos linfócitos (seta pontilhada).

6.1.10 Análise macroscópica dos baços

Na avaliação do baço do grupo G1 (solução salina a 0,9% de NaCl), foi observado aspecto de normalidade preservando sua forma e volume (Figura 18 - Imagem 1A e 1B). No grupo G2: MSSA *pvl* (-) o baço apresentou a forma anatômica preservada e volume aumentado ao ser comparado com o grupo controle G1 (Figura 18 - Imagem 2A e 2B). O grupo G3: MSSA *pvl* (+), o baço manteve sua forma preservada com diminuição do volume quando comparado com o grupo controle G1, foi observada uma região enegrecida no ápice (Figura 18 - Imagem 3B). No grupo G4: MRSA *pvl* (+) o baço apresentou o volume aumentado, sua forma se manteve com aspecto e cor normal (Figura 18 - Imagem 4A e 4B). O grupo G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT, o baço apresentou perda da forma anatômica, a região inferior mais larga e a superior mais estreita, com a coloração avermelhada (Figura 18 - Imagem 5A).

Figura 18 - Macroscopia da face anterior e posterior dos baços

CONTROLE	MSSA *pvl* (-)	MSSA *pvl* (+)	MRSA *pvl* (+)	MRSA *pvl* (+) USA300 WT
1A	2A	3A	4A	5A
1B	2B	3B	4B	5B

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF.

6.1.11 Análise histopatológica dos baços

Na análise macroscópica do baço do grupo G1 (solução salina a 0,9% de NaCl), a polpa vermelha apresentou sinusóides congestos, na polpa branca alguns folículos exibiram aumento com hipercelularidade no centro germinativo e na região periférica (Figura 19 - Imagem A e B). No grupo G2: MSSA *pvl* (-), a polpa vermelha apresentou sinusóides congestos, na polpa branca alguns folículos exibiram aumento com hipercelularidade no centro germinativo e na região periférica onde houve perda da sua delimitação devido à migração de linfócitos para a polpa vermelha (Figura 20 - Imagem A e B). O grupo G3: MSSA *pvl* (+) mostrou perda da delimitação dos folículos, onde ocorre a invasão de linfócitos à polpa vermelha que apresenta vários macrófagos foliculares e com sinusóides distribuídos de maneira difusa (Figura 21 - Imagem A e B). No baço do grupo G4: MRSA *pvl* (+) exibiu o centro germinativo rarefeito, a zona cortical do parênquima com rarefação linfocitária, algumas regiões apresentaram a completa perda do folículo se dispersando através da polpa vermelha com a migração linfocitária a luz dos sinuzóides, ainda na polpa vermelha foi observada a presença de macrófagos foliculares (Figura 22 - Imagem A e B). O grupo G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT, a polpa vermelha apresentou maior congestão, o folículo com rarefação e migração linfocitária da região periférica do folículo para a polpa vermelha onde estão presentes vários macrófagos foliculares (Figura 23 - Imagem A e B).

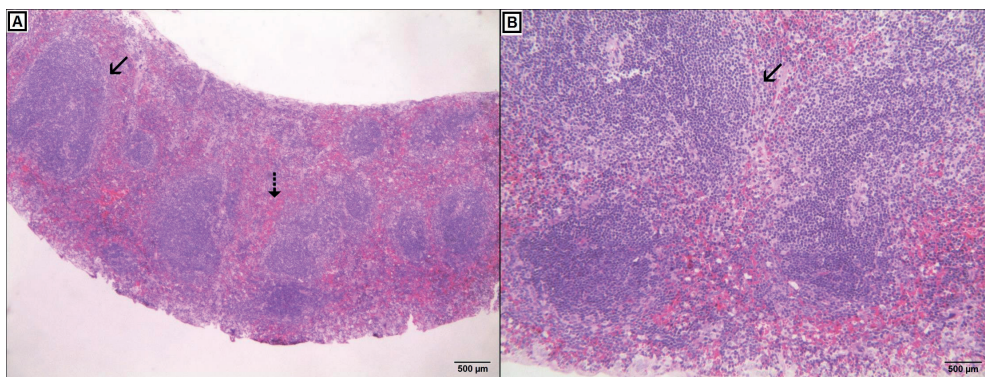
Figura 19 - Microscopia do baço explantado após 96 horas do grupo G1 (controle - inoculado com solução salina estéril a 0,9% de NaCl) e corado em HE

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF. Imagem A (100x) polpa vermelha com sinusóides congestos (seta pontilhada), polpa branca com alguns folículos aumentados por hipercelularidade (seta). Imagem B (400x) polpa branca com centro germinativo e região periférica apresentando hipercelularidade (seta).

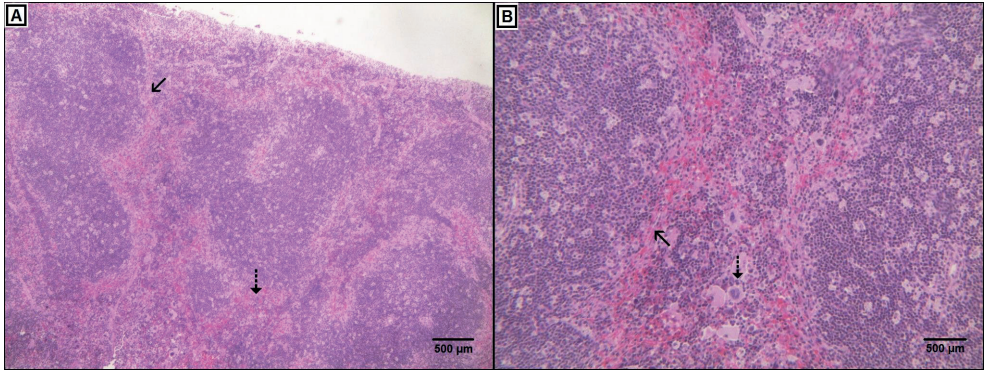
Figura 20 - Microscopia do baço explantado após 54 horas e 46 minutos do grupo G2: MSSA *pvl* (-) e corado em HE

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF. Imagem A (100x) polpa vermelha com sinusóides congestos (seta pontilhada), polpa branca com folículos aumentados por hipercelularidade (seta). Imagem B (400x) ausência dos limites da polpa branca causada por hipercelularidade e invasão de linfócitos na polpa vermelha (seta), macrófago folicular (seta pontilhada).

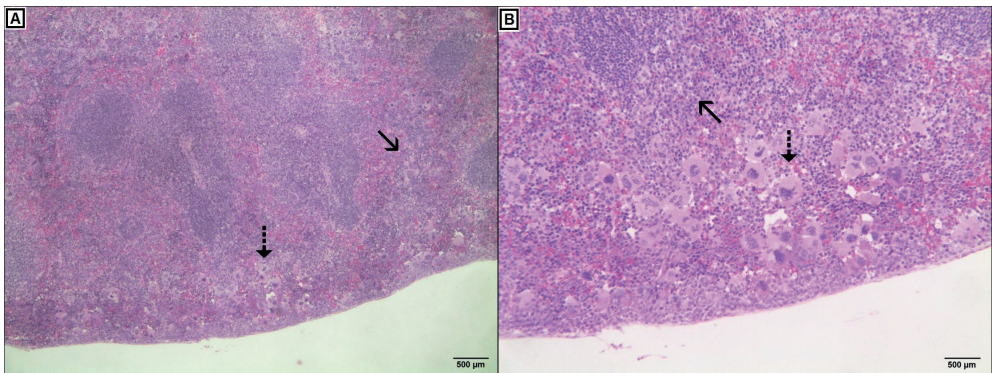
Figura 21 - Microscopia do baço explantado após 96 horas do grupo G3: MSSA *pvl* (+) e corado em HE

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF. Imagem A (100x) perda da delimitação do folículo por invasão dos linfócitos na polpa vermelha (seta), macrófagos foliculares (seta pontilhada). Imagem B (400x) perda da delimitação do folículo que se distribui de maneira difusa à luz dos sinusóides com presença de inúmeros linfócitos (seta), macrófagos foliculares (seta pontilhada).

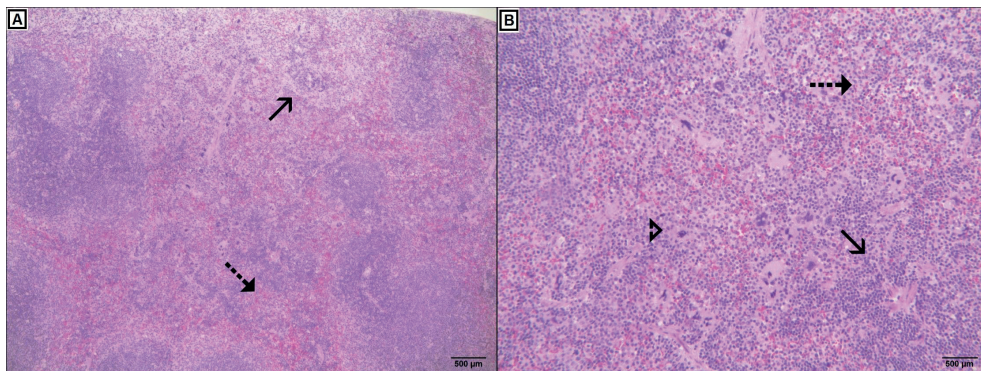
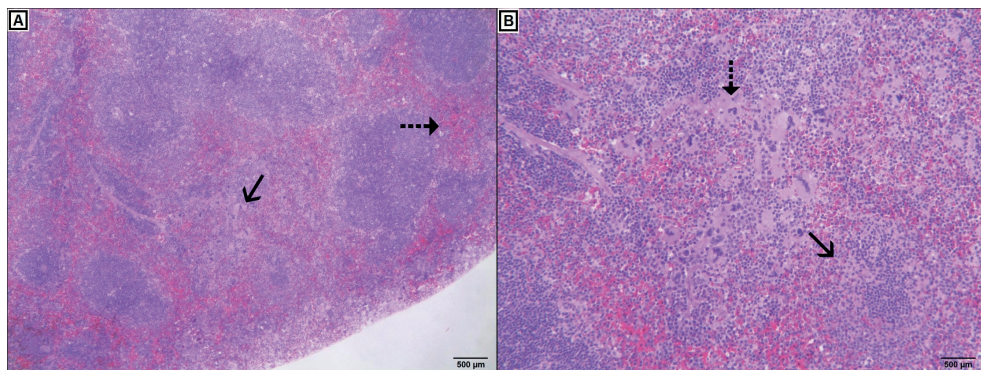
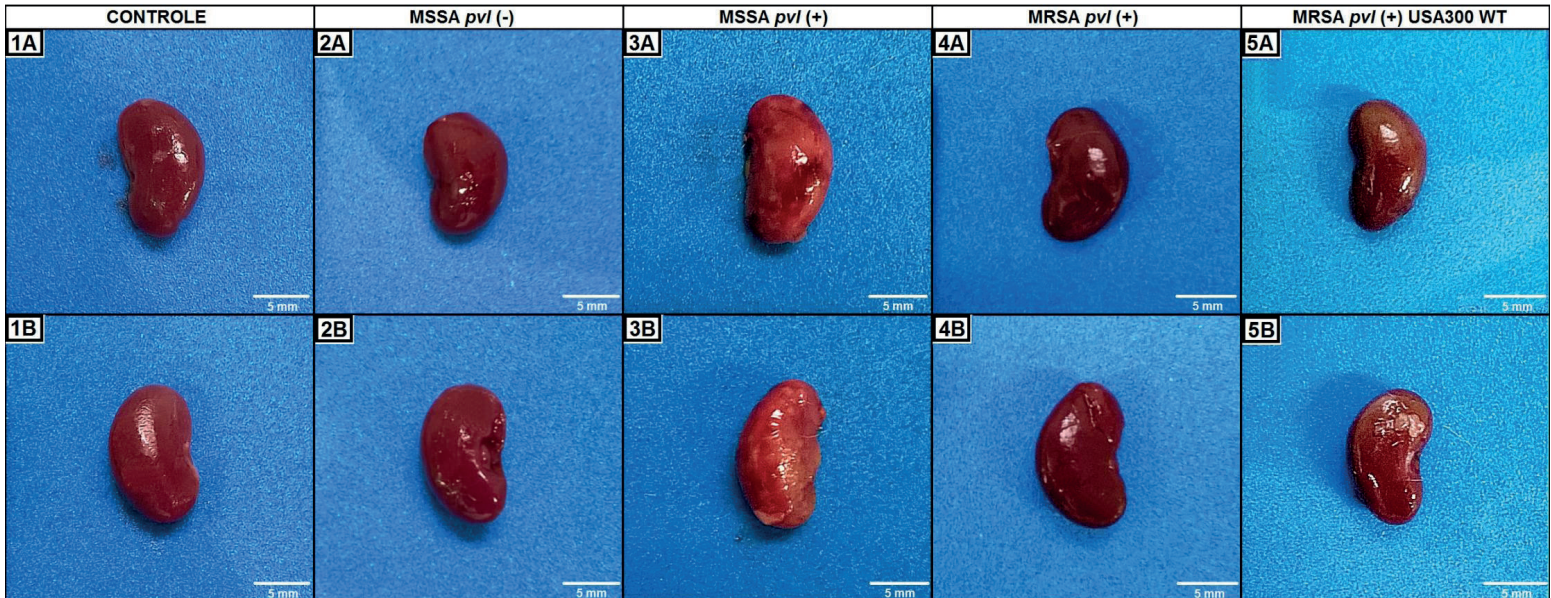
Figura 22 - Microscopia do baço explantado após 96 horas do grupo G4: MRSA *pvl* (+) e corado em HE

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF. Imagem A (100x) centro germinativo com rarefação linfocitária (seta), congestão da zona cortical do parênquima esplênico (seta pontilhada). Imagem B (400x) dispersão do folículo com invasão na polpa vermelha (seta pontilhada), migração dos linfócitos a luz dos sinusóides (seta) e macrófagos foliculares (seta vazada).

Figura 23 - Microscopia do baço explantado após 96 horas do grupo G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT e corado em HE

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF. Imagem A (100x) degradação do folículo com rarefação celular por migração linfocitária para a polpa vermelha (seta), congestão da polpa vermelha (seta pontilhada). Imagem B (400x) rarefação linfocitária da região periférica do folículo (seta) macrófago folicular (seta pontilhada).

6.1.12 Análise macroscópica dos rins

Na análise histopatológica do rim do grupo G1 (solução salina a 0,9% de NaCl), não foi observada qualquer alteração, o órgão apresentou superficie lisa e cor avermelhada (Figura 24 - Imagem 1A e 1B). No grupo G2: MSSA *pvl* (-), foi observada a forma normal e o volume diminuído, quando comparado com o grupo controle G1, exibiu lesão puntiforme amarelada na face anterior (Figura 23 - Imagem 2A) e na região côncava também (Figura 24 - Imagem 2B), a superfície do tecido apresentou cor vinhosa e lisa. O grupo G3: MSSA *pvl* (+), apresentou leve diminuição do volume ao ser comparado com o grupo controle G1, irregularidade na região côncava e perda da homogeneidade na coloração que se estendeu em todo o tecido, algumas regiões apresentaram palidez de consistência friável, outras avermelhadas chegando a coloração vinhosa, de distribuição difusa e irregular por todo o órgão (Figura 24 - Imagem 3A e 3B). No grupo G4: MRSA *pvl* (+) apresentou forma e volume preservados, com a superfície lisa e coloração avermelhada (Figura 24 - Imagem 4A e 4B). Na análise do rim do grupo G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT apresentou sua forma normal a superfície do tecido com coloração avermelhada (Figura 24 - Imagem 5A e 5B).

Figura 24 - Macroscopia da face anterior e posterior dos rins

CONTROLE	MSSA *pvl* (-)	MSSA *pvl* (+)	MRSA *pvl* (+)	MRSA *pvl* (+) USA300 WT
1A	2A	3A	4A	5A
1B	2B	3B	4B	5B

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF.

6.1.13 Análise histopatológica dos rins

Na análise histopatológica do rim do grupo G1 (solução salina a 0,9% de NaCl) foram observados os glomérulos com celularidade normal, os túbulos contornados com citoplasma róseo e abundante (Figura 25 - Imagem A e B). No grupo G2: MSSA *pvl* (-) foi observado glomérulo tumefeito com massa bacteriana, túbulos com necrose do epitélio de revestimento (eosinofilia) apresentando perda dos limites celulares e núcleos com cariólise (Figura 26 - Imagem A e B). O grupo G3: MSSA *pvl* (+) foi observado alguns glomérulos congestos e outros apresentando células glomerulares invadindo o espaço de Bowman, as estruturas tubulares apresentando perda dos limites e alguns núcleos com cariólise, ainda uma discreta vacuolização (Figura 27 - Imagem A e B). No grupo G4: MRSA *pvl* (+) apresentou estruturas glomerulares com aumento da celularidade ocasionando diminuição do espaço de Bowman, os túbulos com perda do epitélio de revestimento e celularidade, as células com seus núcleos mostrando cariólise. Os vasos exibindo congestão (Figura 28 - Imagem A e B). Na análise histopatológica do rim do grupo G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT foi observada a presença de massas bacterianas no interior de estrutura glomerular com presença de células inflamatórias mono e polinucleares ocasionando desaparecimento do espaço de Bowman, as estruturas tubulares alterações de maneira difusa com perda de células e núcleos com cariólise ainda a presença de vacuolização mais intensa, alguns vasos de médio calibre com congestão (Figura 29 - Imagem A e B).

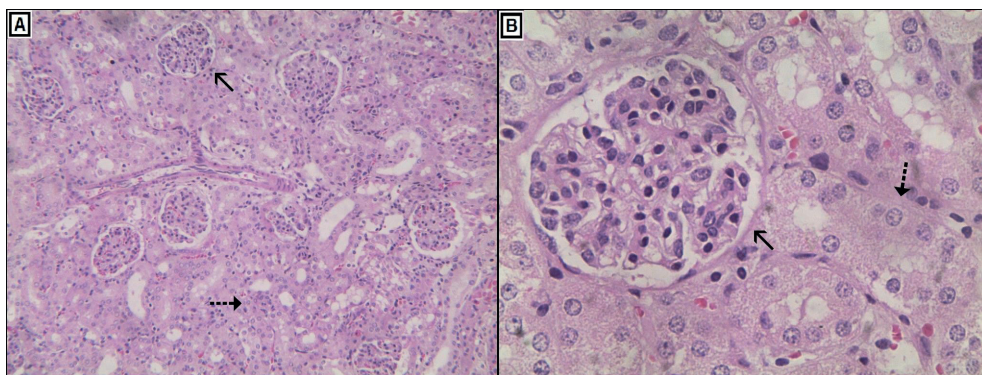
Figura 25 - Microscopia do rim explantado após 96 horas do grupo G1 (controle - inoculado com solução salina estéril a 0,9% de NaCl) e corado em HE

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF. Imagem A (200x) glomérulos com aspecto de normalidade, espaço de Bowman preservado (seta), estruturas tubulares mantendo o revestimento do epitélio preservado (seta pontilhada). Imagem B (400x) glomérulo com celularidade normal e espaço de Bowman preservado (seta), túbulos com epitélio de revestimento conservado (seta pontilhada).

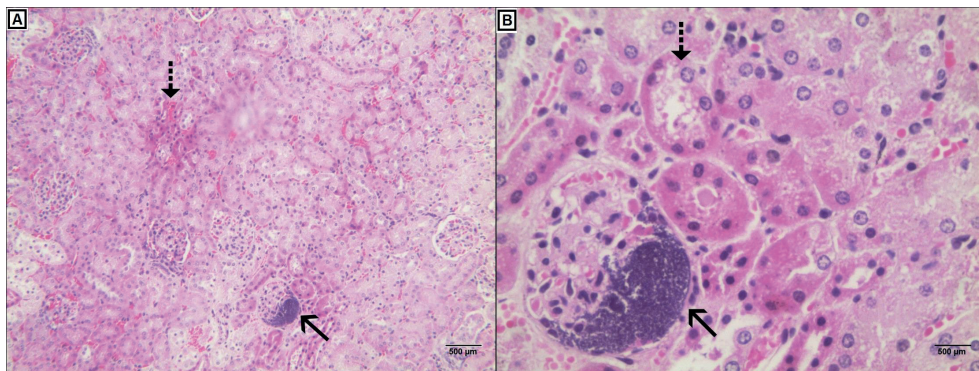
Figura 26 - Microscopia do rim explantado após 54 horas e 46 minutos do grupo G2: MSSA *pvl* (-) e corado em HE

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF. Imagem A (100x) glomérulo apresentando massa bacteriana com celularidade e volume aumentado (seta), congestão capilar (seta pontilhada). Imagem B (400x) glomérulo com volume e celularidade aumentados com presença de massa bacteriana e perda do espaço de Bowman (seta), túbulos com necrose do epitélio de revestimento (eosinofilia) e perda dos limites celular, núcleos com cariólise (seta pontilhada).

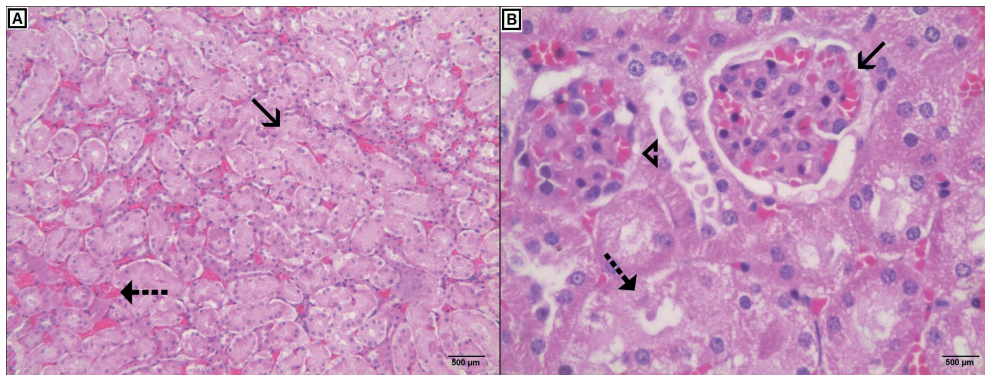
Figura 27 - Microscopia do rim explantado após 96 horas do grupo G3: MSSA *pvl* (+) e corado em HE

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF. Imagem A (100x) estruturas tubulares com perda do epitélio de revestimento e alguns núcleos com cariólise (seta), interstício com capilares congestos (seta pontilhada). Imagem B (400x) glomérulo congesto, porém com o espaço de Bowman preservado (seta), glomérulo circunvizinho congesto e invasão de células glomerulares no espaço de Bowman (ponta de seta vazada), túbulos com perda do epitélio de revestimento e ausência de delimitação, núcleos apresentando cariólise (seta pontilhada).

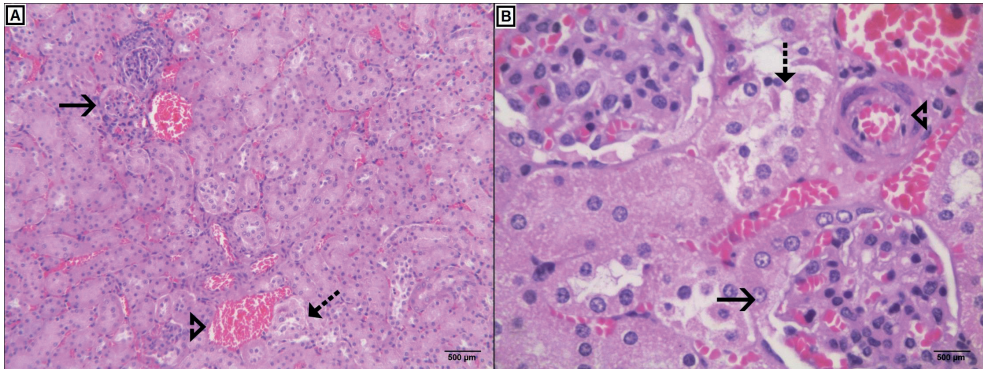
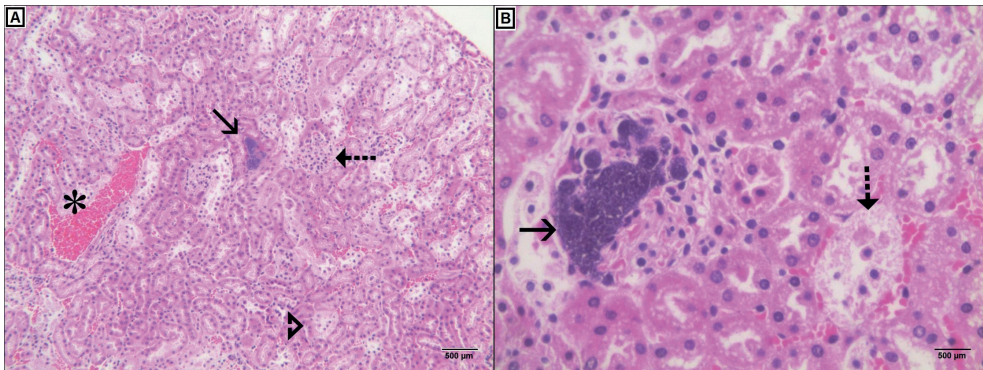
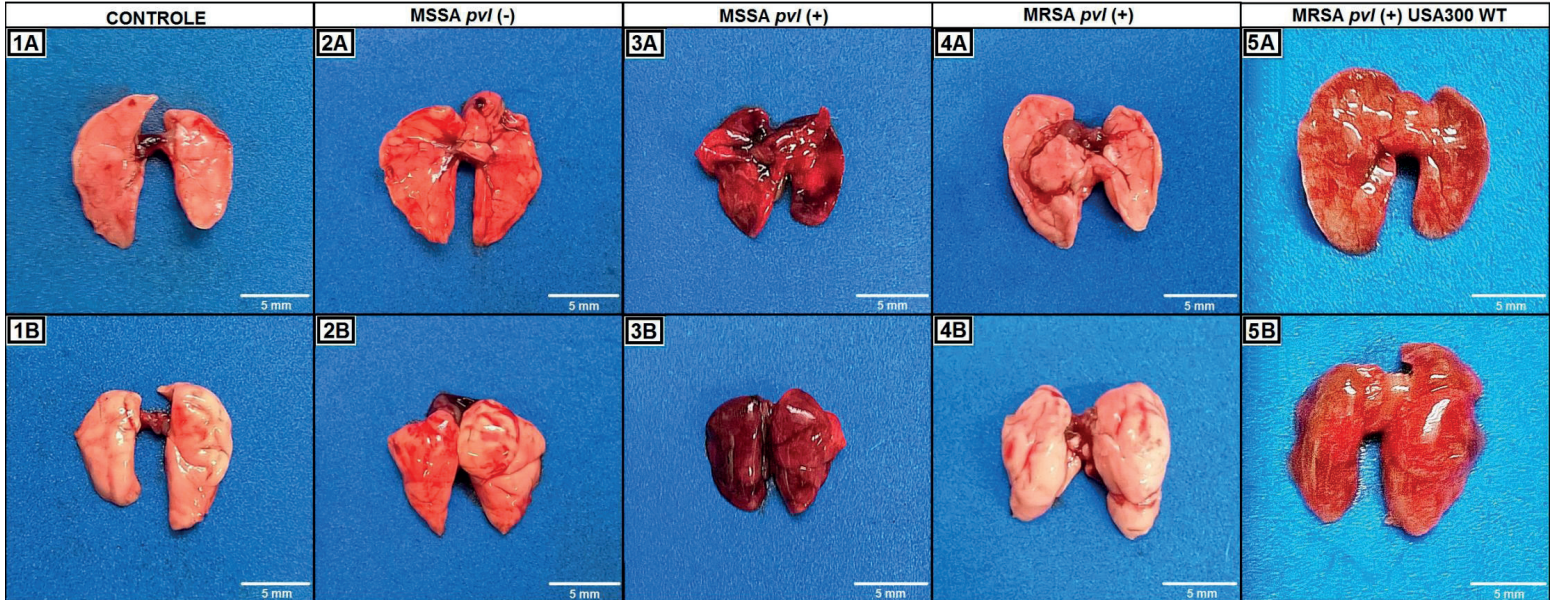
Figura 28 - Microscopia do rim explantado após 96 horas do grupo G4: MRSA *pvl* (+) e corado em HE

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF. Imagem A (100x) estruturas glomerulares com celularidade aumentada (seta), estruturas tubulares exibindo perda do epitélio de revestimento e da celularidade, com núcleos apresentando cariólise (seta pontilhada), no interstício os vasos com congestão (seta vazada). Imagem B (400x) glomérulo com celularidade aumentada causando redução do espaço de Bowman (seta), estruturas tubulares com perda do epitélio de revestimento e da celularidade, núcleos celulares com cariólise (seta pontilhada), vasos no interstício apresentando congestão (ponta de seta vazada).

Figura 29 - Microscopia do rim explantado após 54 horas e 30 minutos do grupo G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT e corado em HE

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF. Imagem A (100x) massa bacteriana (seta), estrutura glomerular com aumento de celularidade (seta pontilhada), estruturas tubulares com alterações difusas e perda celular com núcleos apresentando cariólise (ponta de seta vazada), vaso de médio calibre com congestão (asterisco). Imagem B (400x) estrutura glomerular com massa bacteriana apresentando células inflamatórias mono e polinucleares ocasionando perda o espaço de Bowman (seta), túbulos com necrose do epitélio de revestimento e perda da celularidade, discreta vacuolização (seta pontilhada).

6.1.14 Análise macroscópica dos pulmões

A análise dos pulmões do grupo G1 (solução salina a 0,9% de NaCl) mostrou estrutura e forma com aspectos normais, os pulmões apresentavam coloração rosea, crepitação reduzida e vasos pérvios e amplos (Figura 30 - Imagem 1A e 1B). Ao exame macroscópico, os pulmões do grupo G2: MSSA *pvl* (-) apresentaram volume aumento, entretanto mantendo a forma anatômica ao comparamos com o grupo controle, no pulmão esquerdo foi observado uma coloração rósea, já no pulmão direito apresentou coloração avermelhada. O órgão apresentou crepitação reduzida e ausência de lesões e vasos pérvios (Figura 30 - Imagem 2A e 2B). Na análise dos pulmões do grupo G3: MSSA *pvl* (+) foi constatado o aumento do volume do pulmão direito e esquerdo, sendo mais evidente nos lobos esquerdos com perda da forma anatômica com crepitação presente e reduzida e a superfície de coloração avermelhada em toda a extensão do tecido. Algumas regiões apresentando pequenas áreas vinhosas e vasos pérvios (Figura 30 - Imagem 3A e 3B). Na análise dos pulmões do grupo G4: MRSA *pvl* (+) foi observado que suas formas se mantiveram normais, porém com o volume aumentado e crepitação reduzida, apresentando coloração rósea opaca (Figura 30 - Imagem 4A e 4B). Na análise dos pulmões do grupo G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT foi observada a perda da forma anatômica, com aumento de volume, a coloração se apresentou avermelhada com regiões e pontos enegrecidos, o tecido apresentou crepitação reduzida (Figura 30 - Imagem 5A e 5B).

Figura 30 - Macroscopia da face anterior e posterior dos pulmões

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF.

6.1.15 Análise histopatológica dos pulmões

Na análise histopatológica dos pulmões do grupo G1 (solução salina a 0,9% de NaCl) foram observadas as estruturas brônquio alveolares apresentando epitélio de revestimento integro com camada muscular preservada, os septos alveolares sem particularidades com celularidade normal e espessura fina e delicada (Figura 31 - Imagem A e B). No grupo G2: MSSA *pvl* (-) foi observada a intensa congestão de vasos de pequeno, médio e grande calibre com aumento da espessura dos septos (Figura 32 - Imagem A e B). Na análise do grupo G3: MSSA *pvl* (+) apresentou a luz dos alvéolos com presença de células inflamatórias e os septos espessados e congestão capilar (Figura 33 - Imagem A e B). O grupo G4: MRSA *pvl* (+) foi observada a luz das estruturas bronquiolares parcialmente preenchida por células inflamatórias. Vaso de grande calibre congesto com parede muscular apresentando necrose e área parcial do parênquima com congestão capilar septal (Figura 34 - Imagem A e B). No grupo G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT foram observadas as estruturas bronquiolares preservadas com luz livre, entretanto a ausência de septos alveolares com perda da arquitetura por preenchimento de líquido de edema e fibrina. Ainda a presença de massas basofilicas (bactérias) de aspecto granular na luz de vasos ocasionado congestão e presença de células inflamatórias (Figura 35 - Imagem A e B).

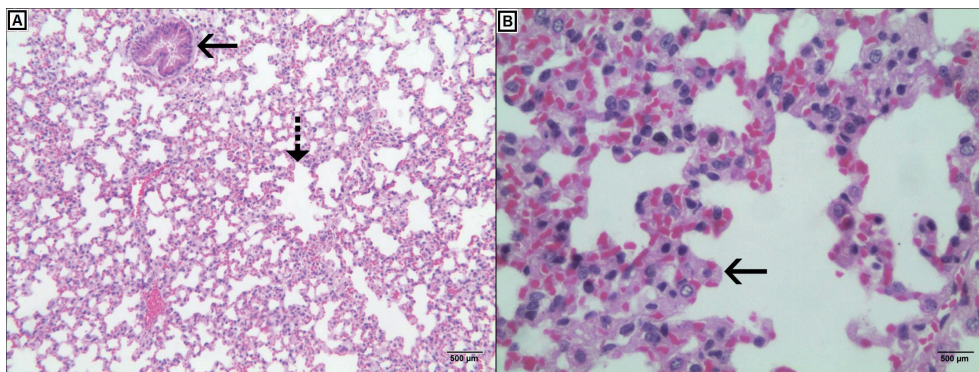
Figura 31 - Microscopia do pulmão explantado após 96 horas do grupo G1 (controle - inoculado com solução salina estéril a 0,9% de NaCl) e corado em HE

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF. Imagem A (100x) estruturas bronquiolares apresentando epitélio de revestimento integro (seta), septos interalveolares sem particularidades e de espessura fina e delicada (seta pontilhada). Imagem B (400x) septos interalveolares com celularidade, espessura e capilares normais (seta).

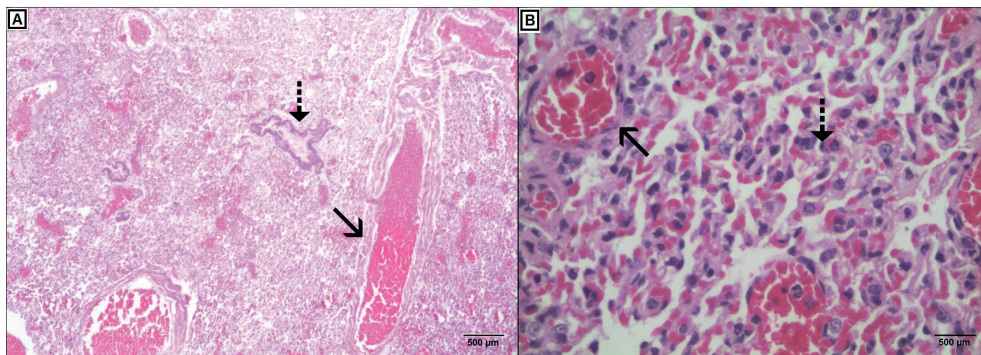
Figura 32 - Microscopia do pulmão explantado após 80 horas e 43 minutos do grupo G2: MSSA *pvl* (-) e corado em HE

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF. Imagem A (100x) estruturas bronquiolares integras (seta pontilhada), intensa congestão de vasos de pequenos, médios e grandes calibres (seta). Imagem B (400x) congestão capilar (seta), aumento da espessura dos septos interalveolar (seta pontilhada).

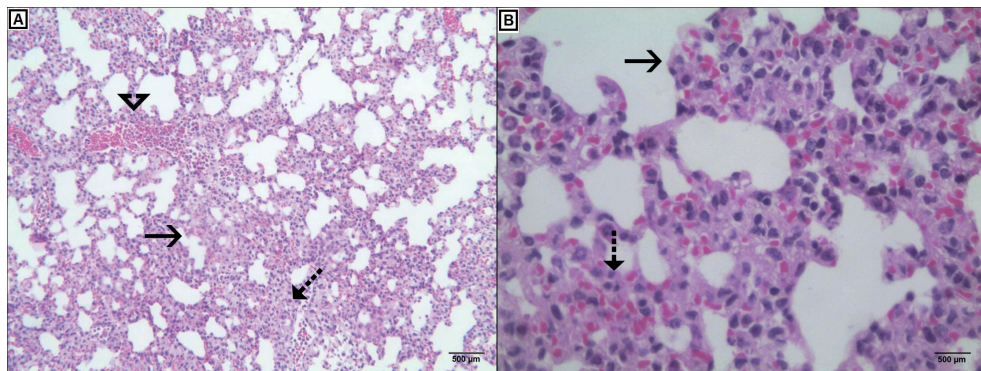
Figura 33 - Microscopia do pulmão explantado após 96 horas do grupo G3: MSSA *pvl* (+) e corado em HE

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF. Imagem A (100x) parênquima pulmonar com algumas luzes dos alvéolos apresentando células inflamatórias (seta pontilhada), septos apresentando espessamento (seta), congestão capilar (ponta de seta vasada). Imagem B (400x) septos espessados (seta), aumento da celularidade e congestão capilar nos septos (seta pontilhada).

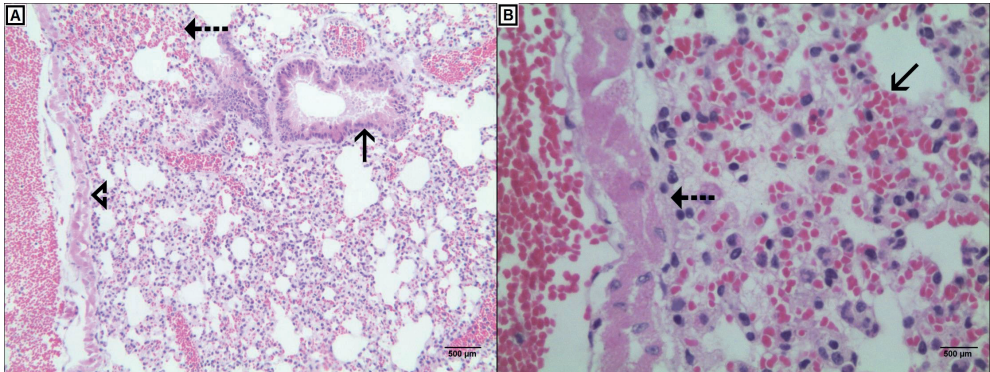
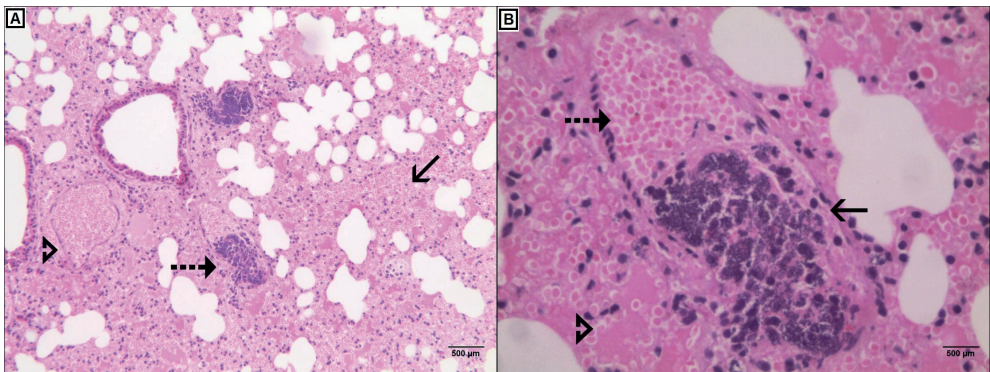
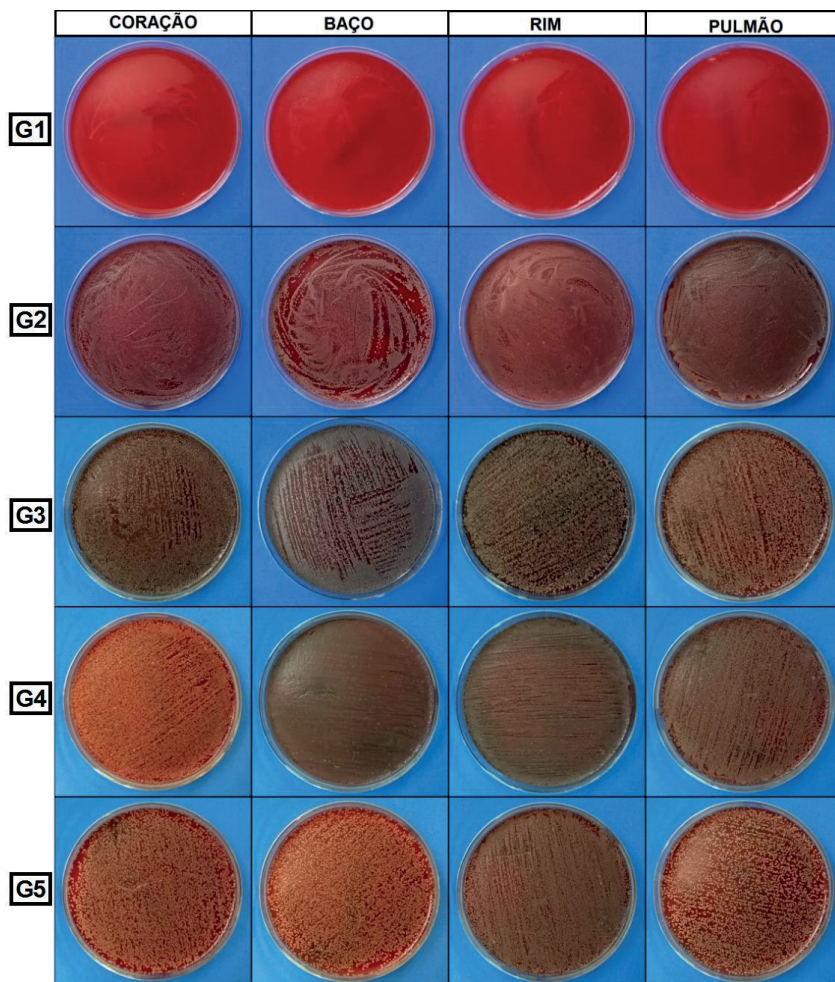
Figura 34 - Microscopia do pulmão explantado após 96 horas do grupo G4: MRSA *pvl* (+) e corado em HE

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF. Imagem A (100x) estrutura bronquiolar apresentando a luz parcialmente preenchida por células inflamatórias (seta), área parcial do parênquima com congestão capilar septal (seta pontilhada), vaso de grosso calibre apresentando tecido necrótico com aspecto hialino (seta vazada). Imagem B (400x) congestão capilar com espessamento dos septos (seta), parede muscular de vaso de grade calibre apresentando necrose (seta pontilhada).

Figura 35 - Microscopia do pulmão explantado após 54 horas e 30 minutos do grupo G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT e corado em HE

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF. Imagem A (100x) perda da arquitetura do tecido e ausência de septos alveolares (seta), massa basofílica de aspecto finamente granular (massa bacteriana) causando congestão e presença de células inflamatórias (seta pontilhada), luz do septo preenchida por líquido de edema e fibrina (ponta de seta vazada). Imagem B (400x) massa bacteriana na luz de um vaso de médio calibre (seta), congestão do vaso (seta pontilhada), exsudato predominantemente fibrinoso preenchendo as luzes dos alvéolos (ponta de seta vazada).

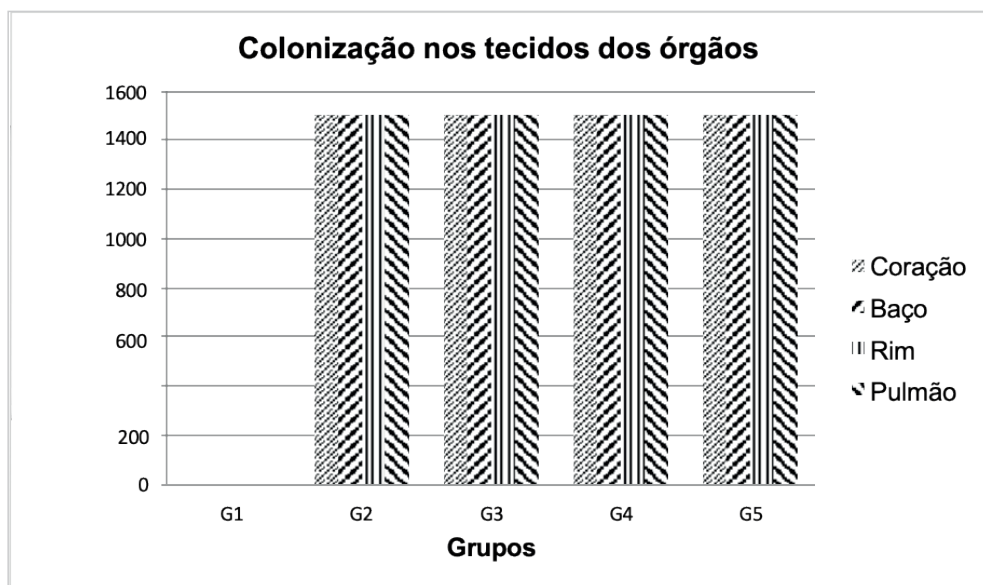
6.1.16 Identificação da colonização tecidual

Com o extrato obtido a partir da maceração dos órgãos e o cultivo de 100 μL do mesmo em ágar sangue, foi constatado que todos os grupos inoculados com as cepas em estudo tiveram os órgãos: coração, baço, rim e pulmões colonizados, apresentando contagem superior 1000 UFC/cm^2. Com a exceção do grupo controle, onde os animais foram inoculados com solução salina estéril (0,9% de NaCl), não foi observada colonização em nenhum dos órgãos analisados (Figura 36).

Figura 36 - Cultura celular do extrato obtido a partir do macerado dos órgãos: coração, baço, rim esquerdo e pulmões

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF. Todos os grupos, G2: MSSA *pvl* (-); G3: MSSA *pvl* (+); G4: MRSA *pvl* (+); G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT, exibiram colonização em quantidades aproximadamente semelhantes, exceto o grupo G1 inoculado com solução salina estéril.

Por não ter sido possível a quantificação de UFC precisa em virtude da quantidade excessiva de colônias, foi utilizada uma análise estimativa de > 1000 UFC/cm^2 e < 1000 UFC/cm^2, para expressar a análise estatística através do gráfico de coluna.

O cultivo de 100 μL do extrato obtido com a maceração da metade do tecido cardíaco, baço, rim e pulmão em ágar sangue mostraram que ambos os grupos G2: MSSA *pvl* (-), G3: MSSA *pvl* (+), G4: MRSA *pvl* (+) e G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT apresentaram quantidades superiores a 1000 UFC/cm^2 colonizando os tecidos, diferentemente do grupo controle, que mostrou ausência de colonização bacteriana (Figura 36 - Gráfico 06).

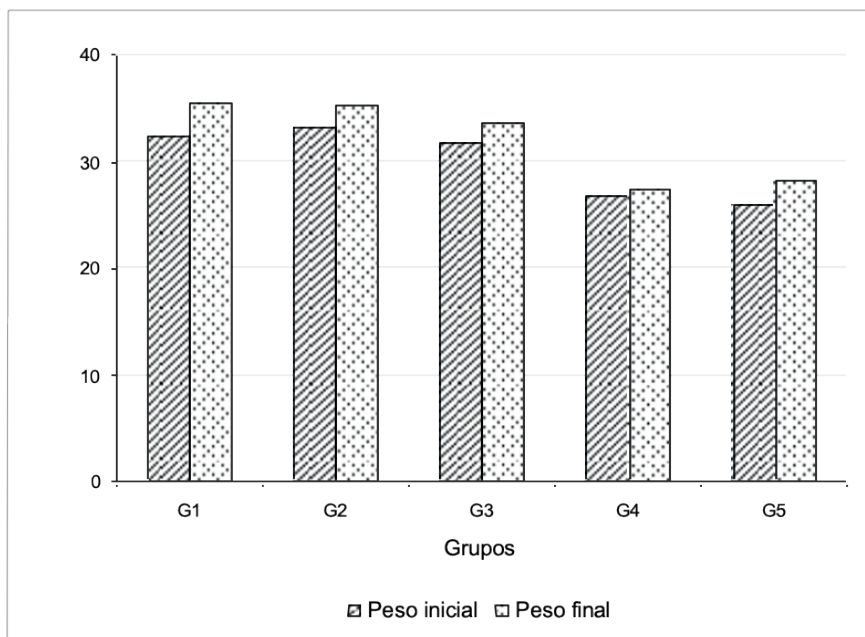
Gráfico 06 - Descrição gráfica comparativa da colonização bacteriana nos tecidos dos órgãos dos diferentes grupos.

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF.

6.2 BIOFILME

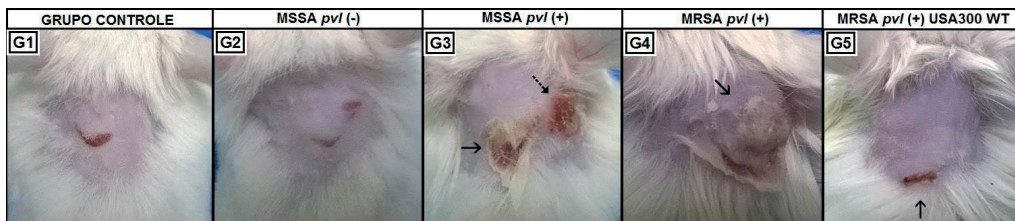
6.2.1 Diferença entre peso final e peso inicial após tempo estimado para formação de biofilme

Ao ser avaliado o peso inicial nos grupos estudados e comparados com o peso final não foram encontrados dados em perda significativos, ou qualquer dado significativo em relação à perda de peso quando comparamos com o grupo controle tanto em relação ao peso inicial quanto ao peso inicial ao nível de significância α = 0,05, conforme apresentado no gráfico 07.

Nos grupos G1: controle e G3: MSSA *pvl* (+), foi observada durante o tempo estimado para o término do experimento (96 horas) a perda de um animal em cda grup devido à competição por liderança da colônia.

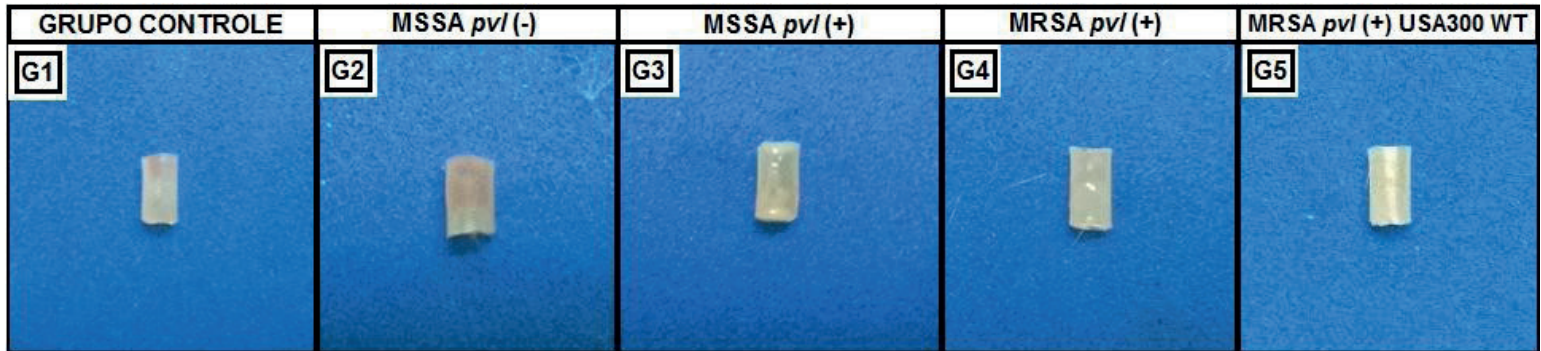
Gráfico 07 - Descrição gráfica comparativa entre peso inicial e peso final

6.2.2 Análise macroscópica dos dorsos dos camundongos

Nenhum dos animais de qualquer grupo morreu antes do desafio de 96 horas (5.760 minutos), apresentou sinais de anorexia, diarréia ou alterações comportamentais. Foi observado no grupo G3: MSSA *pvl* (+) a presença de edema e hiperemia no local de introdução do fragmento de cateter, no local de inoculação da solução contendo a cepa bacteriana foi observado lesão eritematosa com limites imprecisos (Figura 37 - Imagem G3). No grupo G4: MRSA *pvl* (+) foi observado no local de inserção do fragmento de cateter, edema acentuado com áreas multifocais mais claras, ocasionando o descolamento da sutura (Figura 37 - Imagem G4). Nos demais grupos: G1 (controle), G2: MSSA *pvl* (-) e G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT não foram observadas evidencias de infecção no local de inserção do enxerto, a pele se manteve com aspecto normal, entretanto a sutura apresentou lesão ulcerada com bordos nítidos medindo aproximadamente 5,0 cm.

Figura 37 - Macroscopia da região dorsal tricotomizada, local de inserção do fragmento de cateter, exibindo infecção após desafio de 96 horas

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF. Nas imagens G1, G2 ausência de infecção local ou qualquer alteração morfológica da pele; G3 apresenta edema e hiperemia no local de inserção do fragmento de cateter (seta), lesão de limites imprecisos e eritematosa (seta pontilhada); G4 apresenta edema acentuado com áreas multifocais mais claras (seta); G5 pele com aspecto normal, incisão para introdução do fragmento de cateter apresentando lesão ulcerada medindo aproximadamente 5 cm.

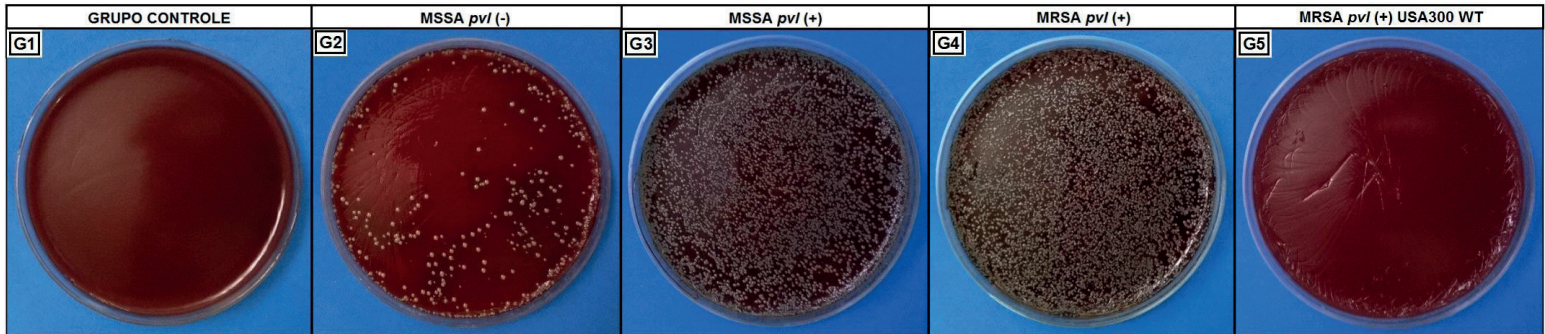
6.2.3 Análise macroscópica dos fragmentos de cateter explantados após desafio

Após o desafio de 96 horas (5.760 minutos) os cateteres explantados dos dorsos dos camundongos foram analisados macroscopicamente em busca de qualquer material aderido, tanto em sua superfície interna quanto externa. Foi constatada a presença de uma película de coloração amarelada aderida tanto no interior quanto no exterior dos fragmentos de cateter dos grupos G3: MSSA *pvl* (+) e G4: MRSA *pvl* (+) sugestivo de biofilme, nos grupos G1 (solução salina estéril - NaCl 0,9%), G2: MSSA *pvl* (-) e G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT não foi identificada a presença de material aderido na superfície externa dos fragmentos de cateter, entretanto no grupo G2 foi constatada a presença de material de coloração avermelhada aderido à superfície interna. Apenas no grupo G1 não houve qualquer evidencia de material aderido no fragmento de cateter (Figura 38).

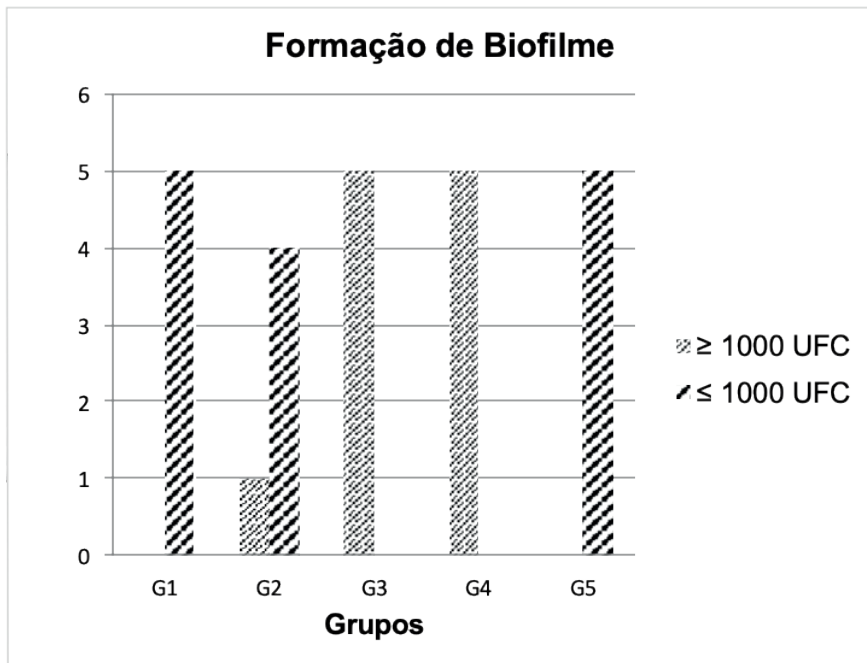
Figura 38 - Macroscopia dos fragmentos de cateteres explantados dos dorsos dos camundongos após desafio de 96 horas (5.760 minutos)

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF. G3 e G4 presentam material aderido à superfície externa de cor amarelada, com áreas micro nodulares opacas, também apresentam o mesmo material aderido à superfície interna. G1, G2 e G5 não foram constatadas a presença de material aderido à superfície externa dos fragmentos de cateter, entretanto na superfície interna do G2 foi observado material de coloração avermelhada aderido.

6.2.4 Identificação da colonização e formação de biofilme em cateter

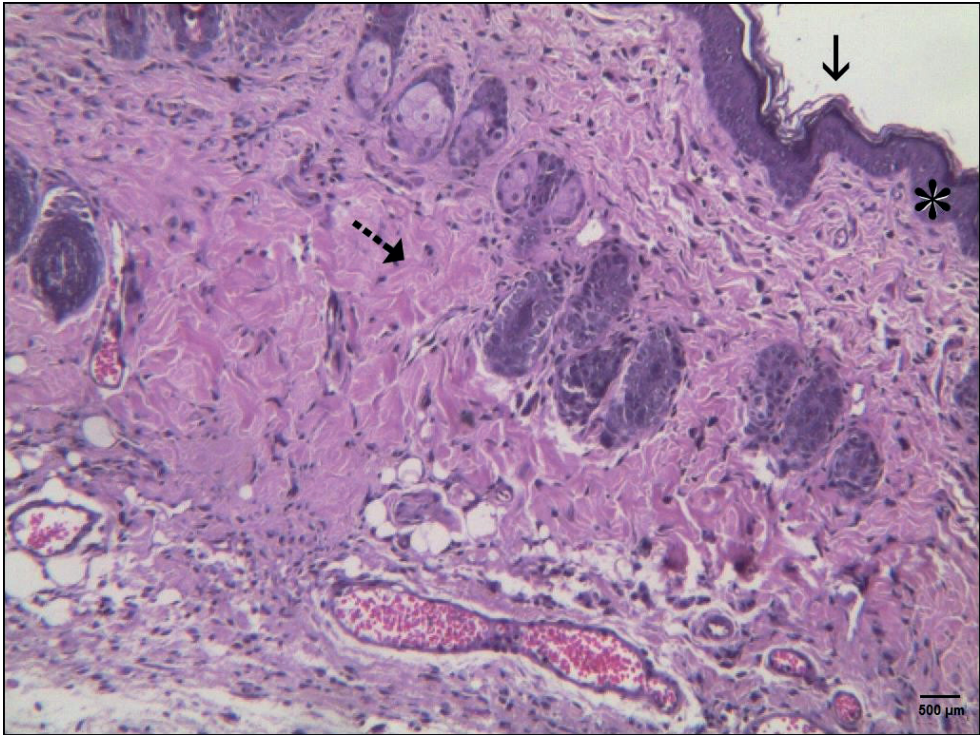
Os cateteres explantados foram colocados separadamente em tubos de ensaio contendo 1000 μL de solução salina estéril (0,9% de NaCl) para cultura quantitativa, com a diluição obtida foi alíquota 100 μL de cada tubo e cultivado em ágar sangue a 5,0%. A cultura quantitativa revelou a ausência de colônias bacterianas nos grupos: G1 (controle) e no grupo G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT (Figura 39 - Imagens G1 e G5 respectivamente), foi observada a presença de colônias bacterianas no grupo G2: MSSA *pvl* (-) com quantidade de 523 UFC/cm^2, insuficiente para causar infecção e caracterizar a formação de biofilme no prazo de 96 horas (Figura 39 - Imagem G2). Nos grupos G3: MSSA *pvl* (+) e G4: MRSA *pvl* (+) foi constatado na cultura de células a presença de uma quantidade superior a 1000 UFC/cm^2, confirmando a colonização e formação de biofilme nos fragmentos de cateteres pelo método quantitativo de cultura suficiente para gerar um processo inflamatório (Figura 39 - Imagens G3 e G4 respectivamente).

Figura 39 - Cultura celular em ágar sangue 5% da diluição obtida a partir dos materiais aderidos aos fragmentos de cateter, após desafio de 96 horas (5.760 minutos)

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF. Grupo G3 e G4 exibe presença de colonização bacteriana superior a 1000 UFC/cm2, o grupo G2 apresentou colonização bacteriana de 523 UFC/cm2, diferentemente nos grupos G1 e G5 onde não houve colonização dos fragmentos de cateter.

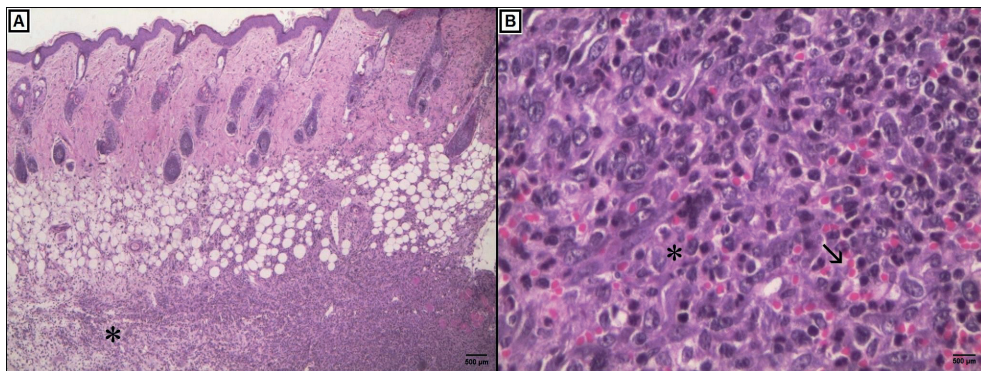
Pela impossibilidade da quantificação com exatidão das UFC nos grupos G3: MSSA *pvl* (+) e G4: MRSA *pvl* (+) em virtude da excessiva colonização bacteriana (Figura 37), foi utilizada uma análise estimativa de ≥ 1000 UFC/cm² e ≤ 1000 UFC/cm², para expressar graficamente os resultados através do gráfico de coluna (Gráfico 08).

Gráfico 08 - Descrição gráfica comparativa da colonização bacteriana nos fragmentos de cateter

6.2.5 Análise histopatológica da pele que revestia o cateter

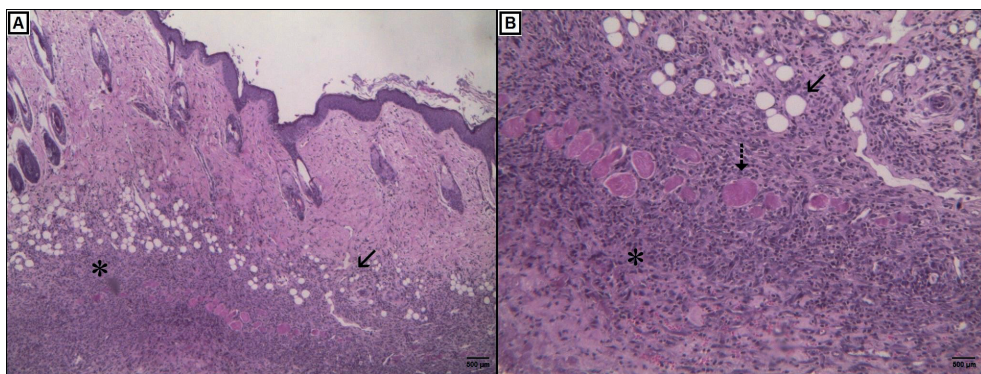
A análise histopatológica da pele que revestia o fragmento de cateter do grupo G1 (solução salina estéril - NaCl 0,9%) exibiu a epiderme integra com a camada córnea presente, seguindo da derme exibiu celularidade normal com tecido conjuntivo de permeio exibindo seus anexos (Figura 40).

Figura 40 - Microscopia da pele do dorso, local onde foi implantado o fragmento de cateter no grupo G1: controle, corada com HE

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF. Epiderme integra (asterisco) com a camada córnea presente (seta), derme com anexos (seta pontilhada) (100x).

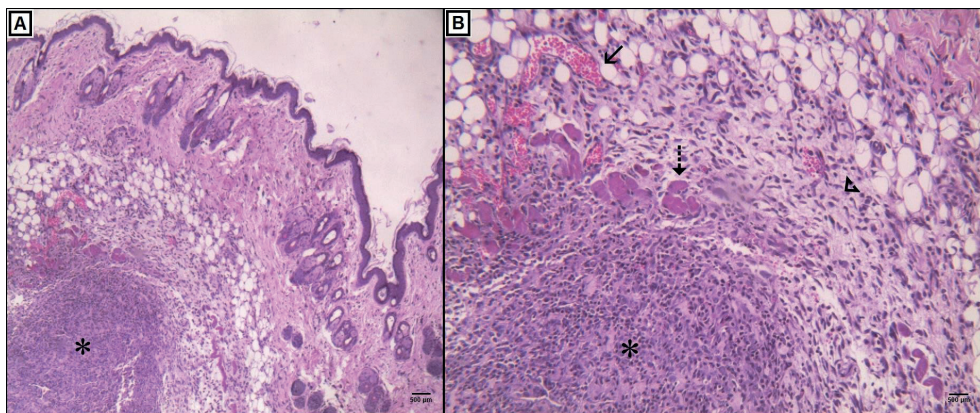
A análise histopatológica da pele do dorso que revestia o fragmento de cateter do grupo G2: MSSA *pvl* (-) apresentou a epiderme e a derme preservadas com seus anexos, os adipócitos da hipoderme apresentaram celularidade aumentada em meio a hemácias e infiltrado inflamatório composto por células leucócitos poli e mononucleares (Figura 41).

Figura 41 - Microscopia da pele do dorso, local onde foi implantado o fragmento de cateter no grupo G2: MSSA *pvl* (-), corada com HE

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF. Imagem A (40x) exibe em meio à adipócitos da hipoderme celularidade aumentada com infiltrado inflamatório (asterisco). Imagem B (400x) grande quantidade de hemácias (seta), infiltrado inflamatório misto, composto por células poli e mononucleares (asterisco).

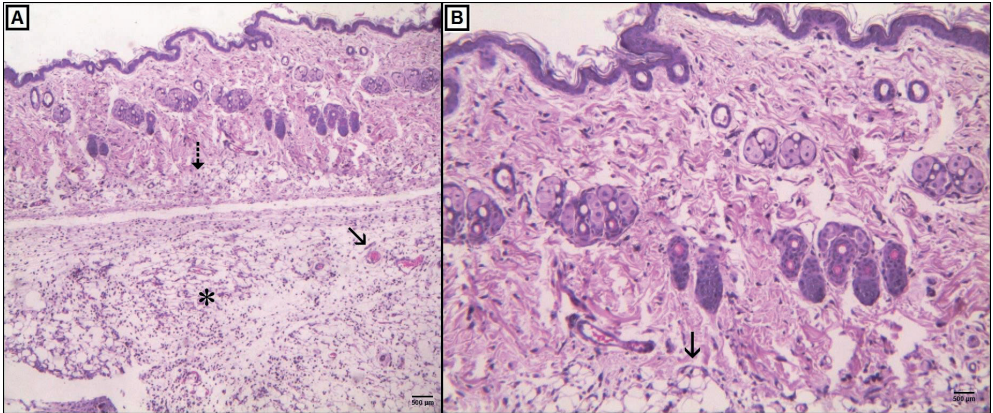
A análise histopatológica da pele do dorso que revestia o fragmento de cateter do grupo G3: MSSA *pvl* (+) exibiu, a epiderme e a derme integras, na hipoderme rarefação de adipócitos com intenso afluxo inflamatório misto de leucócitos poli e mononuclear com expansão entre os adipócitos, ainda a presença de fibrina em meio a hemácias (Figura 42).

Figura 42 **-** Microscopia da pele do dorso, local onde foi implantado o fragmento de cateter no grupo G3: MSSA *pvl* (+), corada com HE

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF. Na imagem A (40x) expansão do afluxo inflamatório (asterisco) e pequena faixa de adipócitos na hipoderme (seta). Imagem B (100x) rarefação de adipócitos na hipoderme (seta), afluxo inflamatório misto (asterisco) e fibrina (seta pontilhada).

Ao ser avaliado histopatológicamente a pele do dorso dos camundongos do grupo G4: MRSA *pvl* (+), foi observada a epiderme e derme integras, na hipoderme em meio às células adiposas a presença de edema e congestão capilar. Abaixo da hipoderme, uma área de necrose com infiltrado inflamatório misto, composto por leucócitos poli e mononuclear e ainda a presença de fibrina (Figura 43).

Figura 43 - Microscopia da pele do dorso, local onde foi implantado o fragmento de cateter no grupo G4: MRSA *pvl* (+), corada com HE

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF. Na imagem A (40x) abaixo da hipoderme área de necrose (asterisco). A imagem B (100x) congestão capilar (seta), edema (ponta de seta vazada), fibrina (seta pontilhada), área de necrose com infiltrado inflamatório (asterisco).

A análise histopatológica da pele do dorso dos camundongos do grupo G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT exibiu a epiderme e a derme preservadas, entretanto com rarefação de células adiposas na hipoderme, infiltrado inflamatório misto invadindo a hipoderme entre os adipócitos chegando a derme e congestão capilar (Figura 44).

Figura 44 - Microscopia da pele do dorso, local onde foi implantado o fragmento de cateter no grupo G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT, corada com HE

Fonte: Silva-Santana (2015). Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - LURA-EX UFF. Imagem A (40x) rarefação de células adiposas na hipoderme (seta pontilhada), congestão capilar (seta), edema com afluxo inflamatório (asterisco). Imagem B (100x) rarefação de adipócitos com perfusão de afluxo inflamatório na derme (seta).

DISCUSSÃO

INFECÇÃO E SEPSE

Em nossos estudos buscamos analisar as infecções causadas por *S. aureus*, em diferentes aspectos tendo como padrão de normalidade o grupo controle, comparamos cepas com características genéticas específicas, como resistência a beta-lactâmicos mediada pelo gene *mec*A e portadoras do gene de virulência *pvl* responsável por tornar as cepas produtoras de PVL mais virulentas, motivo destas cepas estarem associadas clinicamente a abscessos de pele, infecção de tecidos moles e pneumonia necrosante. (BOYLE-VAVRA & DAUM, 2007; LINA *et al.*, 1999)

Para estudarmos as infecções causadas por *S. aureus* foram utilizados camundongos Swiss adultos com seis semanas de vida pesando aproximadamente 34 g. Os animais do grupo controle, inoculados com solução salina estéril (0,9% de NaCl) após 96 horas de desafio foram sacrificados, nos corações foi observado peso médio de 0,161 g e seus rins pesavam aproximadamente 0,217 g. Experimentos realizados por Oliveira & Silva (2004) utilizando camundongos pesando aproximadamente 33 g foi observado pesos semelhantes nos respectivos órgãos do grupo controle. Os demais órgãos como baço e pulmão estão de acordo com os valores já descritos na literatura nos trabalhos de Krink, 2004; Iwaki *et al.*, 2001; Dantas, 2012 em camundongos Swiss nessa mesma faixa etária.

Nos diferentes grupos estudados ao compararmos os pesos corpóreos finais com os iniciais após 96 horas, foi observado que não houve diferença estatística significativa entre os pesos, entretanto constatamos que o grupo G1: controle apresentou maior perda de peso com 4,21 g (11,77%). Fato incomum, pois era esperada a maior perda de peso nos grupos inoculados com as cepas contendo diferentes perfis de virulência. Nos demais grupos também observamos perda de peso, entretanto com valores inferiores ao grupo controle, seguido do grupo G3: MSSA *pvl* (+) com perda aproximada de 3,90 g (11,76%) e o grupo G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT com perda de 2,04 g (6,19%), ambos os grupos inoculados com cepas *S. aureus* produtoras da toxina PVL. Os grupos G2: MSSA *pvl* (-) e G4: MRSA *pvl* (+) apresentaram perda de peso muito semelhante entre si, sendo de 1,64 g (5,12%) e 1,86 g (5,05%) respectivamente. Esses dados mostram que em escala decrescente, quanto menor a virulência da cepa, menor a perda de peso. Constatou-se que os grupos que tiveram menor perda de peso corpóreo G2: MSSA *pvl* (-) e G4: MRSA *pvl* (+) foram os mesmos que tiveram a maior perda de peso nos órgãos como rim e pulmão. O grupo G2: MSSA *pvl* (-) com perda de 0,029 g (12,44%) no rim e o grupo G4: MRSA *pvl* (+) com perda de peso de 0,037 g (15,74%) no pulmão, valores esses comparados com o grupo controle.

Estudo realizado por Wardenburg *et al.* (2008) para analisar infecção pulmonar causada por cepas clinicas *S. aureus* USA300 WT (LAC) e estirpe clínica isogênica mutante *luk*S/F-PV (LACΔpvl) na concentração 4 a 6 x 10^7, inoculadas através da narina esquerda

com volume de 30 μL em camundongos BALB/cJ e BALB/cAnNHsd de sete semanas de idade, resultou em perda de peso de 1,5 g após 48 horas de infecção. Mesmo utilizando uma concentração bacteriana superior, volume de inoculação inferior, tempo de infecção menor e via de inoculação diferente do estudo por nós realizado, os resultados em perda de peso se assemelharam nos grupos inoculados com cepas MSSA *pvl* (-) e MRSA *pvl* (+) inoculados com 50 μL de suspensão bacteriana através da veia caudal na concentração de 10^7 UFC/mL após 96 horas de desafio. Entretanto o resultado obtido com a inoculação de cepa MRSA *pvl* (+) USA300 WT no grupo G5 foi observada a perda de peso de 2,04 g em 96 horas, mostrando ser superior a perda de peso obtida com a cepa USA300 WT (LAC) de 1,5 g em 48 horas por Wardenburg *et al*. (2008), caracterizando uma possível maior virulência da cepa utilizada em nosso estudo.

Ao avaliarmos o tempo de sobrevida dos animais de cada grupo, observamos que os grupos G2: MSSA *pvl* (-), G3: MSSA *pvl* (+) e G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT tiveram o percentual de sobreviventes de 60% (N = 3), já o grupo G4: MRSA *pvl* (+) obteve o percentual de 80% (N = 4) de sobreviventes, valores comparados com o grupo controle que obteve o percentual de sobreviventes de 100% (N = 5).

Wardenburg *et al*. (2008) em estudo já descrito, para avaliar a contribuição da PVL em pneumonia na forma mais agressiva e letal replicou seus experimentos utilizando uma concentração superior de 3 a 4 x 10^8 UFC de *S. aureus*, com o mesmo número de animais por grupo experimental, resultando na mortalidade de 20% dos camundongos BALB/c infectados com USA300 WT (LAC) ao longo de 72 horas. No grupo inoculado com estirpe isogênica mutante *luk*S/F-PV (LACΔpvl) obteve a forma mais grave da doença, com taxa de mortalidade de 80% dos animais infectados.

Comparando os resultados de sobrevida obtidos por Wanderburg *et al*. (2008) com os resultados obtidos em nosso estudo, foi observado que a cepa LACΔpvl não produtora de PVL se mostrou mais letal com mortalidade de 80%, resultado semelhante foi obtido nos grupos G2: MSSA *pvl* (-), G3: MSSA *pvl* (+) e G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT após 72 horas utilizando 50 μL na concentração 10^7 UFC/mL, nesses grupos se encontra a cepa de menor letalidade MSSA *pvl* (-) inoculada no grupo G2: MSSA *pvl* (-) que também obteve maior taxa de mortalidade com 40%. Estes resultados mostram que em ambos os estudos, as cepas de menor letalidade obtiveram altos índices de mortalidade, sugerindo que a produção de PVL não está associada à infecção mais grave em modelo murino, devido a esses modelos só reproduzirem parcialmente a forma como o microrganismo causa a doença em seres humanos, o efeito nulo da PVL nesses modelos pode sugerir que haja uma interação específica entre a PVL e os neutrófilos humanos. (DIEP & OTTO, 2008)

Na comparação dos pesos dos órgãos, foi observada no grupo G4: MRSA *pvl* (+) a maior perda de peso no coração com 0,021 g (12,89%) e o grupo G2: MSSA *pvl* (-) obteve o maior ganho de peso no mesmo órgão com 0,009 g (5,48%). Ao avaliarmos os baços, foi constatado o ganho de peso em todos os grupos, exceto o G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT

onde os baços mantiveram os valores próximos aos do grupo controle de 0,002 g (1,88%), os demais grupos como o grupo G3: MSSA *pvl* (+) com 0,035 g (33,01%), G2: MSSA *pvl* (-) com 0,033 g (31,13%) e G4: MRSA *pvl* (+) com 0,031 g (29,24%) obtiveram significativos ganhos de peso.

Na avaliação dos demais órgãos, observamos que os rins em todos os grupos tiveram perda de peso quando comparados com o grupo controle, entre tanto o grupo G2: MSSA *pvl* (-) foi o de maior perda com 0,029 g (12,44%). Na analise dos pulmões foi constatado maior perda de peso no grupo G4: MRSA *pvl* (+) quando comparado com o grupo controle, de aproximadamente 0,037 g (15,74%) e o grupo G3: MSSA *pvl* (+) com ganho de 0,018 g (7,65%).

Ao compararmos tais dados, observamos que o grupo G4 inoculado com MRSA *pvl* (+), uma cepa clínica isolada de infecção pulmonar, resistente a meticilina e produtora de PVL, apresentou maiores valores de perda de peso no coração (12,80%) e pulmão (15,74%) possivelmente por atrofia e maior valor de ganho de peso no baço (29,24%) possivelmente por hiperplasia devido a grande proliferação de leucócitos em decorrência de um processo inflamatório grave e aumento de hemácias na polpa vermelha. (https://patologia.iptsp.ufg.br/n/4920-baco-hiperplasia)

No grupo G2 inoculado com MSSA *pvl* (-), uma cepa isolada de colonização nasal, sensível a meticilina não produtora de PVL, apresentou maior perda de peso no rim (12,44%) e um valor de ganho no baço superior (31,13%), porém próximo o grupo G4: MRSA *pvl* (+). Ao associarmos estes resultados aos resultados de sobrevida, foi constatado que o grupo G2: MSSA *pvl* (-) obteve 40% de mortalidade similar aos resultados de sobrevida de cepas com maior potencial de virulência como G3: MSSA *pvl* (+) e G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT, nos levando a crer que a cepa inoculada no grupo G2: MSSA *pvl* (-) pode expressar outros fatores de virulência tão ou mais importantes causadores de infecção quanto às demais em estudo produtoras de PVL. Este dado não exclui a grande importância da virulência das cepas inoculadas no grupo G3: MSSA *pvl* (+) e G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT.

As alterações do peso relacionadas ao ganho e perda da massa total corpórea obtidas nesse estudo, provavelmente estão relacionadas a própria infecção, em diferentes fases. Quando na fase inicial de infecção, o edema e a congestão capilar seriam responsáveis pelo ganho de peso e a necrose na perda.

Os aspectos macroscópicos e a histopatologia dos órgãos mostraram resultados de grande relevância. Observamos no grupo controle: G1 que todos os órgãos apresentavam aspectos normais. O coração apresentava forma e volume preservados mesmo com o átrio esquerdo apresentando uma região enegrecida (presença de coágulo), na análise histopatológica, o tecido cardíaco manteve sua disposição habitual sem afastamento das fibras, que se mantiveram em feixes paralelos, os núcleos bem situados no centro das células com a cromatina compacta. Entretanto o baço apresentava a polpa vermelha com sinusóides congestos, a polpa branca alguns folículos exibiam aumento com

hipercelularidade no centro germinativo e na região periférica. Não havia qualquer tipo de lesão no rim, sua superficie se mantinha lisa, os glomérulos com celularidade normal, os túbulos contornados com citoplasma róseo e abundante, o espaço de Bowman integro. No pulmão observamos o tecido com coloração rosea e ausência de lesões, os vasos pérvios, as estruturas brônquio alveolares apresentando epitélio de revestimento integro com camada muscular preservada, os septos alveolares sem particularidades com celularidade normal e espessura fina e delicada. Todos esses aspectos asseguram que o grupo controle: G1 não apresentou qualquer tipo de infecção, assegurando que os animais não apresentavam contaminação prévia e a completa ausência de contaminação entre os grupos após inoculação.

O baço é um órgão rico em elementos do sistema reticulo-endotelial pela produção de linfócitos e monócitos, é importantíssimo na defesa do organismo contra agentes agressivos de várias etiologias: infecciosa, inflamatória ou neoplásica. Sob estímulo ou condições patológicas, na impossibilidade da função medular, assume a função de hematopoese, produzindo eritrócitos, leucócitos e plaquetas (hematopoese extramedular). Esta grande capacidade de metaplasia mielóide, mesmo não sendo específica do baço, possui grande importância na proteção do doente. (PINOTTI, 1963) Nos grupos G2: MSSA *pvl* (-) e G4: MRSA *pvl* (+) observamos o aumento do volume do baço por possível hipertrofia (esplenomegalia). No grupo G3: MSSA *pvl* (+) observamos diminuição do volume do órgão com a região superior enegrecida e no grupo G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT observamos a completa perda da forma anatômica com a região inferior dilatada e a superior atrofiada. Em todos os grupos observamos a perda da uniformidade da polpa branca e do centro germinativo, esse fator se deve possivelmente por grande produção de anticorpos de pouca afinidade ou anticorpos do tipo *self* (autoreativos) que são excluídos por apoptose. (http://anatpat.unicamp.br) Isso pode ser justificado pela presença de grande quantidade de macrófagos foliculares com citoplasma abundante (macrófagos de corpos tingíveis), presentes na polpa vermelha dando aspecto de "céu estrelado", responsáveis pela fagocitose dos restos celulares (corpos apoptóticos ou restos nucleares das células que sofreram apoptose) produzidos durante o processo de infecção, (OVALLE & NAHIRNEY, 2014) podendo estar relacionada com a baixa produção de PVL pelas cepas bacterianas colonizando o tecido, pois como já é postulada a baixa produção de PVL ocasiona apoptose em neutrófilos. (DIEP & OTTO, 2008)

Os rins dos grupos G2: MSSA *pvl* (-), G3: MSSA *pvl* (+) e G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT apresentaram diminuição do volume, possivelmente por atrofia. Observamos lesão na face anterior e na região côncava do rim no grupo G2: MSSA *pvl* (-) e completa perda da concavidade no rim do grupo G3: MSSA *pvl* (+). Foi observado nos grupos G3: MSSA *pvl* (+) e G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT alterações na coloração do tecido, no grupo G3 observamos alternância de coloração entre vermelha e acastanhada, no grupo G5 além da coloração acastanhada também foi evidente a opacidade na região superior, tanto anterior

quanto posterior do órgão. Ainda no grupo G3 ficou evidente a presença de pequenos abscessos por toda a superfície do órgão. O estudo microscópico evidenciou nos grupos G2: MSSA *pvl* (-), G4: MRSA *pvl* (+) e G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT a colonização bacteriana intraglomerular, seguida de regiões de necrose no grupo G2, intensa congestão capilar no grupo G3, hiperemia com infiltrado inflamatório neutrofílico no grupo G4 e hiperemia com células necróticas no grupo G5.

Fato comum em todos os grupos foi a congestão glomerular, comum em casos de glomerulonefrite, assim como e alterações vasculares por espessamento de pequenas artérias reduzindo a luz, ocasionando a redução da circulação sanguínea nos glomérulos. A glomerulonefrite aguda se caracteriza pelo aumento de tufos capilares causando a compressão do espaço interno do glomérulo e consequentemente a compressão do espaço de Bowman, aumentando o tamanho do glomérulo. Outro fator que promove o surgimento da glomerulonefrite é a formação e deposição de imunocomplexos com imunoglobulinas G (IgG) por infecção microbiana, ativando e fixando o complemento através da fração C5a que por quimiotaxia atraem neutrófilos para os glomérulos impedindo seu funcionamento. (MARQUES *et al*., 2010)

Estudo realizado por Lima *et al*. (2011) utilizando inoculação de LPS obtido da cepa 0111:B4 de *Eschericia coli* na concentração de 36 unidades endotóxicas/ml (UE/ml) e inoculação de *Eschericia coli* 0111:B4 (ATCC 12015) na concentração de 10^6 unidades formadoras de colônias (10^6 UFC/ml), ambas as diluições inoculadas através da veia dorsal peniana de *Rattus norvegicus albinus, Rodentia mammalia* dividido em quatro grupos LPS1 (Inoculação a cada 24 horas por 7 dias), LPS2 (Inoculação a cada 48 horas por 7 dias), EC1 (Inoculação a cada 24 horas por 7 dias) e EC2 (Inoculação a cada 48 horas por 7 dias). A análise microscópica dos rins, fígado e pulmões revelou nos grupos EC1 e EC2 mortos em sete dias, a presença de congestão, edema, hemorragia e necrose tubular acompanhado de infiltrado inflamatório, resultados semelhantes foram observados no grupo G2: MSSA *pvl* (-) (necrose), G3: MSSA *pvl* (+) (hemorragia), G4: MRSA *pvl* (+) (hiperemia e infiltrado inflamatório) e G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT (hiperemia e necrose). Atualmente, no ambiente de terapia intensiva (UTI) a sepse tem se tornado uma das grandes causas de insuficiência renal aguda, em estudo prospectivo a incidência da insuficiência renal aguda foi de 19% em pacientes sépticos, de 23% naqueles com sepse grave e de 51% em pacientes com choque séptico. (FIGUEIREDO *et al*., 2004; LIMA *et al*., 2011)

Ao avaliarmos as condições dos pulmões dos grupos em estudo, foi observado que em todos os grupos o órgão se apresentou com o volume aumentado, com alteração na coloração de suas superfícies, no grupo G2: MSSA *pvl* (-) e G4: MRSA *pvl* (+) o tecido se apresentou com a coloração de rosa opaco a vermelha, já no grupo G3: MSSA *pvl* (+) e G5: MRSA *pvl* (+) USA300 WT a coloração se apresentou de vermelha a acastanhada com pontos enegrecidos e evidente perda da forma anatômica. Nos grupos G3 e G5 o espessamento dos septos alveolares e hiperemia intra-alveolar, ainda no grupo G5 os vasos se encontram

obstruídos por colônias bacterianas ocasionando estase sanguínea e necrose tecidual. No grupo G4 estava presente hiperemia, os septos com áreas destruídas com presença de grande afluxo inflamatório neutrofílico e bronquíolos com hiperplasia do epitélio. No grupo G2 foi observada necrose do epitélio de revestimento bronquiolar e descamação. Resultados semelhantes foram observados em estudo realizado por Wardenburg *et al*. (2008) descrito anteriormente, utilizando cepas clínicas *S. aureus* USA300 WT (LAC) e estirpe clínica isogênica mutante *luk*S/F-PV (LACΔpvl) através da inoculação intranasal mostrou infecção de pulmão com acúmulo de infiltrado inflamatório no espaço alveolar em iguais proporções em ambos os grupos. Lima *et al*. (2011) na análise do pulmão em seu estudo constatou na macro e na microscopia dos pulmões dos animais do grupo EC1 intensa hemorragia. Aspectos semelhantes foram observados nos grupos G3, G4 e G5 com hiperemia em nosso estudo.

A colonização do tecido se mostrou presente em todos os órgãos pela histopatologia, resultado que corrobora com os obtidos na cultura celular a partir do extrato dos órgãos cultivados em ágar sangue, que também mostrou que todos os órgãos estavam colonizados pelas cepas estudadas em iguais proporções e em quantidades superiores a 1000 UFC/cm^2. Resultados semelhantes foram observados por Santana *et al.* (2015) com a maceração dos órgãos: coração, baço e rim, cultivando em ágar sangue uma alíquota de 100 μL do extrato obtido através dos órgãos, mostrando que ambos os órgãos se apresentaram colonizados pelas cepas inoculadas MSSA e MRSA. A inoculação através da via nasal por Wardenburg *et al*. (2008), com cepas *S. aureus* não se mostrou tão eficiente na colonização dos pulmões quanto o método de inoculação endovenosa utilizado em nosso estudo. Em suas análises, constatou-se que após 48 horas obteve quantidade < 100 UFC/cm^2 no pulmão direito, nos resultados obtidos em nosso estudo foi observado após 96 horas, colonização superior a 1000 UFC/cm^2 no pulmão direito de todos os animais.

Staphylococcus aureus está envolvido na formação de abscessos de pele e infecção em tecidos moles, (LOWY, 1998; KIM *et al*., 2014) observamos nos grupos estudados algumas alterações nos locais de inoculação (veia lateral da cauda) como intensa infecção nos grupos G2: MSSA *pvl* (-), G3: MSSA *pvl* (+) e G4: MRSA *pvl* (+) que culminou com ulceração e hiperemia, na região distal da cauda apresentou perda da extremidade por necrose e na proximal exibiu palidez e espessamento por edema. Em apenas um dos animais do grupo G3 ainda foi observado uma região circular com perda de pelos e hiperemia na pata posterior direita, acompanhado de forte edema testicular. No grupo G4 um animal além de apresentar os aspectos já mencionados ainda apresentou infecção em ambos os olhos, composta por material purulento cobrindo as escleras e edema palpebral. Até o presente momento não foram relatados resultados semelhantes na literatura.

No presente estudo foi adotado o modelo de indução de sepse através da via endovenosa por ser um método simples, facilmente controlado e reproduzível. Vimos como desvantagem a ausência de um foco de infecção, o que poderia acarretar em um processo séptico abrupto. (LIMA *et al*., 2011)

Pesquisas experimentais utilizando infecções estafilocócicas com CA-MRSA expressando PVL tem sido utilizadas para investigar o papel da leucocidina na patogênese das infecções por *S. aureus*, porém os resultados tem sido conflitantes, principalmente no que se refere a pneumonia, talvez pela variedade de modelos e de cepas utilizadas em estudo. (VOYICH *et al.*, 2006; WARDENBURG *et al.*, 2007; WARDENBURG *et al.*, 2008) Os dados obtidos em nosso estudo para avaliar as infecções causadas por *S. aureus* e a influência da PVL utilizando modelo experimental com camundongos Swiss e cepas de colonização nasal, de infecção e com o genótipo USA300, nos revelou que a produção de PVL não é um fator exclusivo e necessário para a patogênese de qualquer doença. O que corrobora com o estudo realizado por Wardenburg *et al.* (2008) utilizando cepas *S. aureus* isolado clínico (LAC) representante do genótipo CA-MRSA e seu mutante de deleção isogênico PVL, por inoculação através da narina esquerda e injeção subcutânea no flanco direito.

"Então qual seria a função da PVL nas infecções por *S. aureus*?"

Segundo Wardenburg *et al.* (2008), o aumento significativo em tamanho de abscesso e de mortalidade por pneumonia entre as cepas não produtoras de PVL podem preparar o hospedeiro na resposta inflamatória e facilitar o reconhecimento do patógeno.

BIOFILME

Cerca de 45% aproximadamente das infecções hospitalares estão associadas a materiais estranhos contaminados ou dispositivos médicos implantados. Infecções relacionadas a MRSA em cateteres tem sido uma grave complicação em cirurgia vascular, chegando a ser motivo de morbidade e mortalidade em pacientes hospitalizados. (TARO *et al.*, 2013) Os enxertos vasculares possuem material susceptível a colonização de microrganismos, causando infecção por contaminação direta no momento da implantação ou bacteremia após processo operatório. Uma grande dificuldade relacionada com a infecção de cateter está no diagnóstico, pois não existe uma relação entre aspectos clínicos e achados laboratoriais microbiológicos para uma possível interpretação de resultados, pois as culturas positivas podem demonstrar tanto colonização quanto contaminação do cateter. A prevenção desse tipo de infecção é essencial, pois comumente resulta na excisão do enxerto, com efeitos importantes sobre a morbidade e mortalidade. (STORTI *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2011)

Á evidência de que um cateter pode estar associado a uma infecção é confirmada quando o mesmo é removido do local onde está inserido no paciente, extraída a ponta distal e submetida a uma cultura. O isolamento de um mesmo microrganismo obtido da ponta do cateter e do sangue do paciente indica que o cateter está relacionado com a infecção. (STORTI *et al.,* 2007)

Existem muitos métodos utilizados para cultura de ponta de cateter, contudo o padrão ouro é o método quantitativo ou semi-quantitativo. (STORTI *et al.*, 2007) No presente estudo optamos pelo método quantitativo, que tem por base a sonicação do fragmento de cateter para a obtenção dos microrganismos que nele estiverem colonizando.

Sherertz *et al.* (1990) relata uma comparação entre três metodologias empregadas na cultura de ponta de cateter, chegando a seguinte conclusão: o método de rolagem de cateter em placa obtém sensibilidade de 60,0%; o de *flush* ou lavagem interna do lúmen obtêm 40,0% a 50,0% e método de sonicação obtêm sensibilidade de 80,0% sendo o mais apropriado na detecção de colonização.

Foi observado no método de estudo que utilizamos (sonicação) a sensibilidade ≥ 80% semelhante à descrita por Sherertz *et al.* (1990). Estudo realizado por Santana *et al.* (2015), utilizando a mesma metodologia de implante de cateter, porém utilizando a técnica de rolagem para obtenção dos microrganismos aderidos ao cateter extraído do dorso de ratos Wistar após infecção no prazo de 72 horas, inoculados subcutaneamente com 30 μL de solução contendo MRSA e MSSA, mostrou sensibilidade aproximada de 60% no cultivo em ágar sangue do material aderido a superfície externa do cateter. A técnica de rolagem obtém os microrganismos que estão aderidos apenas na superfície externa do cateter, diferentemente da técnica de sonicação que extrai os microrganismos das superfícies interna e externa. Esse dado confirma maior sensibilidade na metodologia adotada em nosso estudo, para que obtivéssemos resultados de maior confiabilidade.

Para verificar o percentual de colonização nos fragmentos de cateter implantados no dorso de camundongos Swiss adultos pelo método de sonicação, utilizamos cepas oriundas de colonização nasal e de infecção pulmonar, e constatamos que nenhum dos animais de qualquer grupo apresentou sinais de anorexia, diarréia ou alterações comportamentais, durante o desafio de 96 horas. Estes aspectos também não foram descritos em estudo semelhante realizado por Atahan *et al.* (2009) utilizando cepa clinica MRSA ATCC 43300 na concentração de 2 x 10^7 UFC/ml, inoculadas em dorso de ratos Wistar onde foram inseridos enxertos de Dacron, tratadas e não tratadas com profilaxia antibiótica.

Obtivemos como resultado local de inserção do fragmento de cateter no grupo G3 inoculado com MSSA *pvl* (+), infecção do tecido epitelial e no grupo G4 inoculado com MRSA *pvl* (+), infecção do tecido epitelial com edema local, ambos inoculados com 50 μL de suspensão bacteriana produtora de PVL, na concentração de 10^7 UFC/ml. Aspectos diferentes na resposta infecciosa local foram relatados por Santana *et al.* 2015, em ambos os grupos MSSA e MRSA foi observada a mudança da coloração da pele de vermelha a cianótica sugestivo de necrose e locais de desprendimento de camadas da epiderme. Nenhum desses aspectos foram relatados por Atahan *et al.* (2009). Estas evidências demonstram que a produção de PVL pode estar associada a maior infecção em tecidos moles. Aspectos diferentes foram encontrados no grupo G2 inoculado com cepa nacional sensível a meticilina *pvl* (-) e no grupo G5 inoculado com MRSA USA300, ambas as cepas

não se mostraram capazes de causar lesão na pele, apesar da linhagem USA300 estar envolvida em epidemias de infecções de pele em comunidades dos Estados Unidos. (TALAN *et al*., 2011; KIM *et al*., 2014)

Em nosso estudo, foi observada a presença de uma película de cor amarelada aderido a superfície interna e externa dos fragmentos de cateteres nos grupos G3: MSSA *pvl* (+) e G4: MRSA *pvl* (+), sugestivo de biofilme. Este resultado corrobora com os resultados obtidos por Santana *et al*. (2015), que constatou também a presença de material semelhante nos fragmentos de cateteres explantados dos grupos inoculados com cepas MSSA e MRSA.

O cultivo do material aderido ao fragmento de cateter no grupo G2 inoculado com cepa MSSA *pvl* (-) provou a presença das mesmas no cateter, porém em quantidade inferior a 1000 UFC/cm^2, apresentando apenas 523 UFC/cm^2. Nos grupos G3 inoculado com cepa MSSA *pvl* (+) e G4 inoculado com cepa MRSA *pvl* (+) onde foi observado a presença de película de cor amarelada, através do cultivo de 100 μL da solução obtida pelo método de sonicação comprovou a presença das cepas inoculadas no cateter em uma concentração superior a 1000 UFC/cm^2, aspecto semelhante observado por Atahan *et al*. (2009), onde os grupos não tratados com profilaxia antimicrobiana apresentaram infecção e colonização do enxerto, confirmado na cultura quantitativa de 100 μL da solução obtida com o cateter que resultou em $1{,}2 \times 10^5 \pm 9{,}7 \times 10^4$ UFC/cm^2. Estudo realizado por Santana *et al*. (2015) com a cultura através do método de rolagem em ágar sangue também constatou que a película ao redor do cateter nos grupos MSSA e MRSA era formada inteiramente por microrganismos em uma contagem superior a 1000 UFC/cm^2.

A análise de 118 pontas de cateteres venosos centrais do tipo Intra-Cath® de lúmem único, Vialon®, 1,7 mm x 30,5 cm, Becton Dickson - BD de pacientes adultos de ambos os sexos internados em Unidade de Terapia Intensiva, foram analisadas. Para a cultura quantitativa foi extraída, 2,0 cm da porção distal, da diluição uma alíquota de 100 µL foi cultivada em ágar sangue correlacionando a contagem de colônias com a diluição inicial (um décimo), o crescimento ≥ 10^3 UFC/ml confirma a colonização do cateter. (STORTI *et al*., 2007) Neste estudo 50% das infecções em cateteres foram causadas por *S. aureus* e dos quatro casos de bacteremia a maioria dos microrganismos isolados eram MRSA. Os achados de *Staphylococcus spp*. mostrou ser o isolado mais frequente da ponta de cateter, com possibilidades da origem da infecção ser oriunda da pele do próprio paciente, ocasionada pelo manuseio do material pelo pessoal envolvido no procedimento cirúrgico. (STORTI *et al*. 2007)

Ao analisarmos o tecido epitelial dorsal que revestia o fragmento de cateter nos camundongos constamos no grupo G1 (controle), que o mesmo se manteve integro preservando todas as suas estruturas, a camada córnea se manteve rica em queratina, na epiderme observamos entre suas estruturas as glândulas sebáceas, posteriormente, a derme constituída de tecido conjuntivo frouxo e denso não modelado, seguida da hipoderme

constituída de células adiposas. Tomamos como padrão esses aspectos para analisar e comparar os demais grupos.

Nos grupos inoculados com *S. aureus* pela via intradérmica observamos que todos os processos patológicos tinham início abaixo da hipoderme, como rarefação de adipócitos, infiltrado inflamatório, necrose e deposição de fibrina. Estes resultados corroboram com as afirmações de que CA-MRSA tende a ser mais virulentos que HA-MRSA, e que CA-MRSA estão associados a infecções de pele e tecidos moles. (COSTERTON *et al*., 1999; TAN *et al*., 2013)

Estudos realizados por Wardenburg *et al*. (2008), utilizando camundongos BALB/cJ e BALB/cAnNHsd inoculados por meio de injeção subcutânea no flanco direito com 50 μL de suspensão contendo cepas *S. aureus* LAC e LACΔpvl na concentração de 1 x 10^7 UFC/mL, mostraram que após 96 horas de infecção, a pele removida para análise histopatológica mostrou produção de abscessos dermonecróticos. Aspectos semelhantes também foram vistos em nossos estudos em todos os grupos inoculados com *S. aureus* com a mesma concentração de unidades formadoras de colônias

Atahana *et al*. (2009) ao inocular cepa clinica MRSA ATCC 43300 na concentração de 2 x 10^7 UFC/mL em dorso de ratos Wistar tratadas e não tratadas com profilaxia antibiótica, onde foram inseridos enxertos de Dacron observou ao analisar histopatologicamente o tecido circundante intensa inflamação no grupo contaminado não tratado, resultado semelhante observado em nosso estudo. Apesar de em nosso estudo não avaliarmos a influência da profilaxia antibiótica é válido ressaltar que, na avaliação da intensidade de proliferação de fibroblastos, o grupo controle apresentou significativamente menores taxas de proliferação do que os outros grupos. A quantidade de colágeno foi significativamente menor nos grupos contaminados e tratados. Em se tratando da neovascularização, todos os grupos foram compatíveis. A quantidade de edema foi significativamente maior no grupo tratado com linezolida, teicoplanina e vancomicina em comparação com o grupo contaminado e não tratado. Ao ser avaliada a intensidade da inflamação o grupo II (contaminação por MRSA, sem profilaxia antibiótica), também foi observado um decréscimo significativo na proliferação de fibroblastos, edema e síntese de colágeno quando em comparação com os outros grupos. Estes resultados mostraram que a inflamação exercia um efeito negativo sobre a cicatrização de feridas. No que diz respeito à neovascularização, não houve diferença significativa entre os grupos, mostrando que a neovascularização não foi influenciada pela infecção assim como a intensidade da inflamação. (ATAHANA *et al*., 2009)

CONCLUSÃO

Verificar o percentual de mortalidade, por cada grupo após o desafio no prazo de 96 horas de observação, nos modelos de sepse e biofilme.

Após o desafio no prazo de 96 horas, a mortalidade foi observada nos grupos de sepse, provavelmente relacionada a via endovenosa de inoculação.

Identificar e quantificar as unidades formadoras de colônias em extratos de tecido cardíaco, baço, rim esquerdo e pulmão, em cada grupo, através de cultura celular no modelo de sepse.

Todos os animais do grupo de sepse apresentaram colonização quantitativamente semelhante por *Staphylococcus aureus* nos órgãos estudados.

Quantificar em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em cateter subcutâneo implantado para avaliar a formação de biofilme em cada grupo, através de cultura celular.

Nos grupos G3: MSSA *pvl* (+) e G4: MRSA *pvl* (+) foram observadas quantidades de colônias suficientes para caracterizar a formação de biofilme, entretanto foi inviável a quantificação. No grupo G2: MSSA *pvl* (-) foi possível quantificar as Unidades Formadoras de Colônias com número insuficiente para caracterizar a formação de biofilme. No grupo G5: MRSA *pvl* (+) USA300 observou- se ausência de colônias.

Identificar as alterações anatomopatológicas, presentes em coração, baço, rim, pulmão, no modelo de sepse, e tecido dorsal, no modelo de biofilme.

Nos dois estudos foi observado aumento progressivo da gravidade nas alterações anatomopatológicas, estando possivelmente relacionadas ao aumento da virulência das cepas inoculadas. Entretanto, as discretas alterações anatomopatológicas registradas no grupo G5: MRSA *pvl* (+) USA300 quando comparado com os demais grupos exige estudos futuros mais detalhados.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

9.1 ARTIGOS PUBLICADOS

SANTANA, G. S.; DIP, E. C.; AGUIAR-ALVES, F. **Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) cause dermonecrosis and bacteremia in rats**. International Research Journal of Microbiology (IRJM). Vol. 6(1) pp. 6-11. 2015. (Apêndice 01).

SILVA-SANTANA, G.; CASTRO, H. C.; FERREIRA, B. L. A.; AGUIAR-ALVES, F. ***Staphylococcus aureus* biofilm development: the urgent need for treatment alternatives**. Journal of Global Biosciences (JGB). Vol. 4. N° 4. 2015. (Apêndice 02).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEM, P. V.; MONTGOMERY, C. P.; HUSAIN, A. N. *et al*. ***Staphylococcus aureus* sepsis and the Waterhouse-Friderichsen syndrome in children**. New Engl J. Med. 353:1245-1251.6. 2005.

AMALARADJOU, M. A. R.; VENKITANARAYANAN, K. **Antibiofilm effect of octenidine hydrochloride on *Staphylococcus aureus*, MRSA and VRSA**. Pathogens. 3,404-416. 2014.

ANDERSEN, M. L.; D´ALMEIDA V.; KO G. M. *et al*. **Procedimentos experimentais. In: Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação**. São Paulo: UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo. p. 45-70, 2004.

ANDRIOLO, A. **Guias de Medicina Ambulatorial e Hospitalar**. UNIFESP/Escola Paulista de Medicina - Medicina Laboratorial. Coordenador Adagmar Andriolo. São Paulo: Manole, 2005.

ANTONIAZZI, P.; PEREIRA, G. A. J.; MARSON. F. *et al*. **Acute respiratory distress syndrome (ARDS)**. Medicina. 31: 493-506, out./dez. 1998.

ANTONIOS, V. S.; NOEL, A. A.; STECKELBERG, J. M. *et al*. **Prosthetic vascular graft infection: a risk factor analysis using a case-control study**. J. Infect. 53(1): 49-55. 2006.

ANVISA. **Gram-positivos**. ***Staphylococcus*** spp. Módulo 4. Disponível em: www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/im p_sta.htm. Acesso em: 13 jul. 2015, 14:05:00.

ARBEIT, R. D.; MAKI, D.; TALLY, F. P. *et al*. **The safety and efficacy of daptomycin for the treatment of complicated skin and skin-structure infections**. Clin. Infect. Dis. 38, 1673. 2004.

ARCHER, N. K.; MAZAITIS, M. J.; COSTERTON, J. W. *et al*. ***Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease**. Virulence. 2(5): 445-459. 2011.

ASSEF, M. A. S.; WÜSTBUF, A. R.; CLEITER, L. Y. *et al*. **Análise da febre em 58 casos de endocardite infecciosa**. Arq. Bras. Cardiol. 58: 107-12. 1992.

ATAHAN, E.; KATRANCIOGLU, N.; OZTOP, Y. *et al*. **Vascular graft infection by *Staphylococcus aureus*: efficacy of linezolid, teicoplanin and vencomycin systemic prophylaxis protocols in a rat model**. Cardiovax J. Afr. 20: 122-125. 2009.

ATSHAN, S. S.; SHAMSUDIN, M. N.; LUNG L. T. *et al*. **Comparative characterisation of genotypically different clones of MRSA in the production of biofilms**. J. Biomed Biotechnol. 417247, 7 pages. 2012.

BARROS, R. T.; ALVES, M. A. R. **Glomerulopatias: patologia, clínica e tratamento**. São Paulo: Sarvier. 319-336 p. 2012.

BEGUN, J.; GAIANI, J. M.; ROHDE, H. *et al*. **Staphylococcal biofilm exopolysaccharide protects against *Caenorhabditis elegans* imune defenses**. PLoS Pathog. 3(4): 57. 2007.

BERGER-BACHI, B.; ROHRER, S. **Factors influencing methicillin resistance in *Staphylococci***. Archives of Microbiology. V. 178, nº 3, p.165-171, 2002.

BLOM, A. M.; HALLSTRÖM, T.; RIESBECKB, K. **Complement evasion strategies of pathogens-acquisition of inhibitors and beyond**. Journal of Molecular Immunology. V. 46, nº 14, p. 2808-2817. 2009.

BOLES, B. R.; HORSWILL A. R. **Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms**. PLoS Pathog. 4(4): e1000052.2008.

BONE, R. C. **The pathogenesis of sepsis**. Ann. Intern. Med. 115: 457-469. 1991.

BONGARD F. S. & SUE D. Y. **Current critical care diagnosis & treatment**. Appleton & Lange. cap. 6, p. 131-155. 1994.

BOYLE-VAVRA, S.; ERESHEFSKY, B., WANG, C. C. *et al*. **Successful multiresistant community-associated methicillinresistant *Staphylococcus aureus* lineage from Taipei, Taiwan, that carries either the novel staphylococcal chromosome cassette mec (SCCmec) type VT or SCCmec type IV**. J Clin Microbiol. 43:4719-4730. 2005.

_. DAUM R. S. **Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine leukocidin**. Laboratory Investigation. 87: 3-9. 2007.

BORGES, L. A. A. **Choque séptico**. Clín. Bras. Med. Intensiva 1: 101-107. 1996.

BRAKSTAD, O. G.; MAELAND, J. A. **Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococci***. APMIS. V. 105, nº 4, p. 264-276. 1997.

BUKOWSKI, M.; WLADYKA, B.; DUBIN, G. **Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus***. Toxins (Basel). 2, 1148. 2010.

CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. ***Staphylococcus aureus* bacteremia: What is the impact of oxacillin resistance on mortality?** Brazilian Journal Infectious Diseases, V. 9, nº 1, P. 70-76. 2005.

(CDC) C. F. D. C. A. P. **Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* - Pennsylvania**. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 18; 51(41): 931. 51(41): 931. 2002.

CHAIEB, K.; ZMANTAR, T.; SOUIDEN, Y. **XTT assay for evaluating the effect of alcohols, hydrogen peroxide and benzalkonium chloride on biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis***. Microb. Pathog. 50: 1-5. 2011.

CHAMBERS, H. F. **Community-associated MRSA-resistance and virulence converge**. N. Engl. J. Med. 352, 1485. 2005.

CHENG, A. G.; KIM, H. K.; BURTS, M. L. *et al*. **Genetic requirements for *Staphylococcus aureus* abscess formation and persistence in host tissues**. FASEB J. 23, 3393. 2009.

CLIMO, M. W.; PATRON R. L.; ARCHER G. L. **Combinations of Vancomycin and b-lactams are synergistic against Staphylococci with reduced susceptibilities to Vancomycin**. Antimicrobial Agentes and Chemotherapy. 43(7): 1747-1753. 1999.

COSTERTON J. W.; STEWART P. S.; GREENBERG E. P. **Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections**. Science. 284(5418): 1318-1322. 1999.

DANTAS, Alexandre Medeiros. **Avaliação da toxicidade e atividade antiulcerogênica das folhas *Spondias purpurea* L**. 2012. 22 f. Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de graduação em Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

DELEO, F. R.; CHAMBERS, H. F. **Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in theantibiotic era**. Nat. Rev. Microbiol. 7, 629. 2009.

DERESINSKI, S. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey**. Clin. Infect. Dis. 40(4): 562-573, 2005.

DIEHL, H. R.; MORTON, D.; PFISTER, R. *et al*. **A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routs and volumes**. J. Appl. Toxical. 21: 15-23. 2001.

DIEP, B. A.; GILL, S. R.; CHANG, R. F. *et al*. **Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. Lancet. 367:731-739. 2006.

__. OTTO, M. **The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis**. Trends Microbiol. 16: 361-369. 2008.

DIFCO & BBL MANUAL. **Manual of microbiological culture media**. Ed. United States of America. 2003.

DO CARMO, J. S.; CAIXETA, A. M.; ABIZAID, A. **Endocardite infecciosa na infância e adolescência**. Arq. Bras. Cardiol. 63(3): 173-7. 1994.

DONELLI, G.; FRANCOLINI, I.; ROMOLI, D. *et al*. **Synergistic activity of dispersin B and Cefamandole nafate in inhibition of Staphylococcal biofilm growth on polyurethanes**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 51(8): 2733-2740. 2007.

EIFF VON, C.; BECKER, K.; MACHKA, K. *et al*. **Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia**. N. Engl. J. Med. 344, 11. 2001.

ENRIGHT, M. C.; ROBINSON, D. A.; RANDLE, G. *et al*. **The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)**. Proc. Natl. Acad. Sci. 99: 7687-7692. 2002.

FENG, Y.; CHEN, C. J.; SU, L. H. *et al*. **Evolution and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*: lessons learned from genotyping and comparative genomics**. Rev. FEMS Microbiol. 32: 23-37. 2008.

FIGUEIREDO, L. F. P.; BORGES, L. A.; RASSLAN, S. **Consenso brasileiro de sepse**. Parte III. RBTI. 16(4): 185-256. 2004.

FORSGREN, A.; NORDSTROM, K. **Protein A from *Staphylococcus aureus*: The biological significance of its reaction with IgG**. Ann. N. Y. Acad. Sci. 236(0): 252-266. 1974.

FOSTER, T. J. **Immune evasion by Staphylococci**. Nat Rev Microbiol. 3(12): 948- 958, 2005.

_. **Colonization and infection of the human host by staphylococci: adhesion, survival and immune evasion**. Journal of Veterinary Dermatology. V. 20. nº 5-6 p. 456-470. 2009.

FOX, P. M.; LAMPEN, R. J.; STUMPF, K. S. *et al.* **Successful therapy of experimental endocarditis caused by Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* with a Combination of Vancomycin and B-Lactam Antibiotics**. Antimicrobial Agentes and Chemotherapy. 50(9): 2951-2956. 2006.

FREITAS, C. C. **Aspectos genéticos-bioquímicos da resistência bacteriana aos antibióticos**. J. Infecções Hospitalares. 207-149. 1989.

FRIDKIN, S. K.; HAGEMAN, J. C.; MORRISON, M. *et al*. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities**. N. Engl. J. Med. 352, 1436. 2005.

FRYMOYER, A.; HERSH, A. L.; BENET, L. Z. *et al.* **Current recommended dosing of Vancomycin for children with invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* infections is inadequate**. The Pediatric Infectious Disease Journal. 28(5): 398-402. 2009.

GANESH, V. K.; RIVERA, J. J.; SMEDS, E. *et al*. **A structural model of the *Staphylococcus aureus* ClfA-fibrinogen interaction opens new avenues for the design of anti-staphylococcal therapeutics**. PLoS Pathog. 4(11): e1000226. 2008.

GENESTIER, A. L.; MICHALLET, M. C.; PREVOST, G. *et al*. ***Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils**. J. Clin. Invest. 115:3117-3127. 2005.

GILLET, Y.; ISSARTEL, B.; VANHEMS, P. *et al*. **Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients**. Lancet. 359:753-759.10. 2002.

GOMES, Otoni Moreira. **Fisiologia cardiovascular aplicada**. Belo Horizonte: Edicor, 2005. 100 p.

GOTZ, F. ***Staphylococcus* and biofilms**. Mol Microbiol, 43(6): 1367-1378. 2002.

HEROLD, B. C.; IMMERGLUCK, L. C.; MARANAN, M. *et al*. **Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no predisposing risk**. JAMA. 279:593-598. 1997.

HIRAMATSU, K.; HANAKI, H.; INO, T. *et al.* **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility**. J. Antimicrob Chemother. 40 135-136. 1997.

IWAKI, T.; YAMASHITA, H; HAYAKAWA, T. **A color atlas of sectional anatomy of the mouse**. Adthree. Tokyo. 2001.

JEFFERSON, K. K. **What drives bacteria to produce a biofilm?** FEMS Microbiol Lett. 236(2): 163-173. 2004.

JONGERIUS I.; KOHL, J.; PANDEY, M. K. ***Staphylococcal* complement evasion by various convertase-blocking molecules**. J. Exp. Med. 204(10): 2461-2471. 2007.

KARAUZUM, H.; ADHIKARI, R. P.; SARWAR, J. *et al*. **Structurally designed attenuated subunit vaccines for *S. aureus* LukS-PV and LukF-PV confer protection in a mouse bacteremia model**. PLoS ONE. 8(6): e65384. 2013.

KIEDROWSKI, M. R.; HORSWILL, A. R. **New approaches for treating staphylococcal biofilm infections**. Ann. N. Y. Acad. Sci. 124: 104-121. 2011.

________. KAVANAUGH, J. S.; MALONE, C. L. *et al.* **Nuclease modulates biofilm formation in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. PLoS One. 6(11): 26714. 2011.

KIM, H. K.; MISSIAKAS, D.; SCHNEEWIND, O. **Mouse models for infectious diseases caused by *Staphylococcus aureus***. Journal of Immunological Methods. 410: 88-99. 2014.

KLEVENS, R. M.; MORRISON, M. A.; NADLE, J. *et al*. **Invasive methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States**. JAMA. 298, 1763. 2007.

KNOBEL, E. **Condutas no paciente grave**. Atheneu. São Paulo. Chapter. 15. p. 175-210, 1994.

KRINK, G. J. **Normative histology of organs**. Anatomy and developmental biology. Elsevier. Chapter 9. p. 134, 2004.

KUBICA, M.; GUZIK, K.; KOZIEL, J. *et al*. **A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: The silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages**. PLoS ONE. 3(1): 1409. 2008.

KUEHL, R.; AL-BATAINEH, S.; GORDON, O. *et al.* **Furanone at subinhibitory concentrations enhances staphylococcal biofilm formation by luxS repression**. Antimicrob Agents Chemother. 53(10): 4159-4166. 2009.

LEE, P. Y.; COSTUMBRADO, J.; HSU, C. Y. *et al.* **Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments**. J. Vis. Exp. (62), e3923. 2012.

LESSA, F. C.; MU, Y.; DAVIES, J. *et al*. **Comparison of incidence of bloodstream infection withmethicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between England and United States, 2006-2007**. Clin. Infect. Dis. 51, 925. 2010.

LIMA, J. B. A.; SKARE, T. L.; MALAFAIA, O. *et al.* **Sepsis inducing syndrome of multiple organ dysfunction: an experimental study in rats**. ABCD Arq. Bras. Cir. Dig. 24(2): 95-102. 2011.

LINA, G.; PIÉMONT, Y.; GODAIL-GAMOT, F. *et al.* **Involvement of Panton- Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia**. Clin. Infect. Dis. 29(5): 1128-1132. 1999.

LIU, C.; BAYER, A.; COSGROVE, S. E.; *et al.* **Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children**. Clinical Infectious Diseases. 1-38. 2011.

LOWY, F. D. ***Staphylococcus aureus* infections**. N. Engl. J. Med. 339, 520. 1998.

MACHADO, A. R.; ARNS, C. C.; FOLLADOR, W. *et al*. **Cost-effectiveness of linezolid versus vancomycin in mechanical ventilation-associated nosocomial pneumonia caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. Braz. J. Infect. Dis. V. 9. nº 3, p.191-200. 2005.

MACK, D.; FISCHER, W.; KROKOTSCH, A. *et al*. **The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis**. J. Bacteriol. 178(1): 175-183. 1996.

MAMIZUKA, E. **Projeto de resistência microbiana em serviços de Saúde, *Staphylococcus*. Gerência-Geral de Tecnologia em Serviços e Saúde**. Brasilia: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2005. Disponível em: www.anvisa.gov.br Acesso em: 23 fev. 2015, 01:53:45.

MAREE, C.; DAUM, R.; BOYLE-VAVRA, S. *et al*. **Rapid temporal increase in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains causing nosocomial infections**. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington. DC. 2006.

MARQUES, V. P.; NEVES, P. D. M. M.; MENDONÇA, H. M. *et al*. **Glomerulonefrite aguda após infecção de vias aéreas superiores ou pele: análise descritiva de 82 pacientes entre 14 e 64 anos de idade**. J. Bras. Nefrol. Vol. 32. Nº. 3. 2010.

MEDRAZI, T. J.; TOMÁZ, V. A.; AMARAL, V. L. L. **Anestesia e analgesia em animais de laboratório. In: Animais de laboratório: cuidados na iniciação experimental**. Florianópolis: Editora da UFSC. p. 101-30. 2004.

MENOITA, E.; SANTOS, V.; TESTAS, C. *et al*. **Biofilms: knowing the entity**. Journal of Aging & Inovation. 1(2): 23-32. 2012.

MICHELIM, L.; LAHUDE, M.; ARAUJO, P. R. *et al*. **Fatores de patogenicidade e resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus epidermidis* associados a infecções nosocomiais em unidades de terapia intensiva**. Braz. J. Microbiol. V. 36. n° 1, P.17-23. 2005.

MILLER, L. G.; PERDREAU-REMINGTON, F.; RIEG, G. *et al*. **Necrotizing fasciitis caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Los Angeles**. N. Engl. J. Med. 352:1445-1453. 2005.

McADOW, M.; KIM, H. K.; DEDENT, A. C. *et al*. **Preventing *Staphylococcus aureus* sepsis through the inhibition of Its agglutination in blood**. PLoS Pathog. 7(10): e1002307. 2011.

McDEVITT, D.; NANAVATY, T.; HOUSE-POMPEO, K. *et al*. **Characterization of the interaction between the *Staphylococcus aureus* clumping factor (ClfA) and fibrinogen**. Eur. J. Biochem. 247, 416. 1997.

McDONALD, C. L.; CHAPIN, K. **Rapid Identification of *Staphylococcus aureus* from blood culture bottles by a classic 2- hour tube coagulase test**. J. Clin. Microbiol. 33:50-52. 1995.

MONGKOLRATTANOTHAI, K.; BOYLE, S.; KAHANA, M. D. *et al*. **Severe *Staphylococcus aureus* infections caused by clonally related community- acquired methicillin-susceptible and methicillin-resistant isolates**. Clin Infect Dis. 37:1050-1058. 2003.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A. *et al*. (Eds) **Manual of Clinical Microbiology**. 9th Ed. Washington D.C.: ASM. 2007.

NEVES, S. M. P. **Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do biotério de produção e experimentação da FCF-IQ/USP**. Produção Editorial e Gráfica, Diagramação: Fabiola Rizzo Sanchez. São Paulo: FCF- IQ/USP. 216 p. il. pag. 113-115, 2013.

NOVICK, R. P.; CHRISTIE, G. E.; PENADÉS, J. R. **The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria**. Nat. Rev. Microbiol. 8, 541. 2010.

O'GARA, J. P. **ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus***. FEMS Microbiol Lett. 270(2): 179-188. 2007.

OLIVEIRA, D. C.; DE LENCASTRE, H. **Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin- resistant *Staphylococcus aureus***. Antimicrob Agents Chemother. 46(7): 2155- 2161. 2002.

OLIVEIRA, G. A.; OKADA, S. S.; GUENTA, R. S. *et al*. **Avaliação da tolerância a Vancomicina em 365 cepas hospitalares de *Staphylococcus aureus* resistentes a Oxacilina**. Jornal Brasileiro de Patologia. V. 37. nº 4. P 239-246. 2001.

O'RIORDAN, K.; LEE, J. C. ***Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides**. Clin. Microbiol Rev. 17(1): 218-234. 2004.

OTTO, M. **Bacterial evasion of antimicrobial peptides by biofilm formation**. Curr Top Microbiol Immunol. 306: 251-258. 2006.

________. **Looking toward basic science for potential drug discovery targets against community-associated MRSA**. Med. Res. Ver. 30(1): 1-22. 2010.

________. **Staphylococcal biofilms**. Curr Top Microbiol Immunol. 322: 207-228. 2008.

OVALLE, William K.; NAHIRNEY, Patrick C. **Netter Bases da Histologia**. Tradução de: Netter's Essential Histology. 2. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 210-212 p. 2014.

PALMQVIST, N.; PATTI, J. M.; TARKOWSKI, A. *et al*. **Expression of staphylococcal clumping factor a impedes macrophage phagocytosis**. Microbes Infect. 6, 188. 2004.

PANTON, P. N.; VALENTINE, F. C. O. **Staphylococcal toxin**. Lancet. 222, 506. 1932.

PARRILO, J. E. **Pathogenetic mechanisms of septic shock**. N. Eng. J. Med. 328: 1471-1477. 1993.

PATTI, J. M.; ALLEN, B. L.; McGAVIN, M. J. *et al*. **MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues**. Annu. Rev. Microbiol. 48:585-617. 1994.

PEREIRA, G. A. J.; MARSON, F.; ABEID, M. *et al*. **Fisiopatologia da sepse e suas implicações terapêuticas**. Medicina. Ribeirão Preto. 31: 349-362. 1998.

PEREIRA, M. S. V. ***Staphylococcus aureus*: O microvilão da resistência a antibióticos**. OnLine, 2002. Disponivel em: www.biologianaweb/biomural/divulga/staph/socorro1.htm. Acesso em: 23 fev. 2012, 13:45:33.

PINOTTI, H. W. **Afecções cirúrgicas do baço**. Revista de Medicina. V. 47. Nº 4. p. 223-232. 1963.

RAMIREZ, P.; FERNÁNDEZ-BARAT I.; TORRES, A. **New therapy options for MRSA with respiratory infection/pneumonia**. Curr. Opin. Infect. Dis. 25: 159-165. 2012.

RÉA, N. A. **Fisiopatologia e manifestações clínicas da sepse**. Clín. Bras. Med. Intensiva 1: 1-9. 1996.

ROBINSON, D. A.; ENRIGHT M. C. **Multilocus sequence typing and the evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. Clin. Microbiol Infect. 10(2): 92- 97. 2004.

ROOIJAKKERS, S. H. M.; VAN KESSEL, K. P. M.; VAN STRIJP, J. A. G. **Staphylococcal innate immune evasion**. Trends in Microbiology. V. 13, nº 12, p. 596-601. 2005.

SANTANA, G. S.; DIP, E. C.; AGUIAR-ALVES, F. **Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) cause dermonecrosis and bacteremia in rats**. International Research Journal of Microbiology (IRJM). Vol. 6(1) pp. 6-11. 2015.

SCHECHTER, M.; MARANGONI, D. V. **Doenças Infecciosas. Conduta, Diagnóstico e Terapêutica**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

SCHUENCK, R. P.; PEREIRA, E. M.; IORIO, N. L. *et al.* **Multiplex PCR assay to identify methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus***. FEMS Immunol Med. Microbiol. 52(3): 431-435. 2008.

SHERERTZ, R. J.; RAAD, I. I.; BELANI, A. *et al.* **Three-year experience with sonicated vascular catheter cultures in a clinical microbiology laboratory**. J. Clin. Microbiol. 28: 76-82. 1990.

SHIRTLIFF, M. E.; MADER, J. T.; CAMPER, A. K. **Molecular interactions in biofilms**. Chem Biol. 9(8): 859-871. 2002.

SHOEMAKER, W. C. **Diagnosis and treatment of the shock syndromes**. Textbook of critical care. 3th ed. cap. 13: p. 85-102. 1995.

SPAAN, A. N.; HENRY, T.; VAN ROOIJEN, W. J. *et al.* **The staphylococcal toxin Panton-Valentine Leukocidin targets human C5a receptors**. Cell Host Microbe. 13, 584. 2013.

SRINIVASAN, A.; DICK, J. D.; PERL, T. M. **Vancomicine resistense in *Staphylococci***. Clinical Microbiology Reviews. P.430-438. 2002.

STEARNS-KUROSAWA, D. J.; OSUCHOWSKI, M. F.; VALENTINE, C. *et al.* **The pathogenesis of sepsis**. Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 6,19. 2010.

STORTI, A.; PIZZOLITTO, A. C.; STEIN, R. A. *et al.* **Biofilm detection on central venous catheter using a quantitative culture method**. Revista Brasileira de Análises Clínicas - RBAC. 39(3): 183-187. 2007.

SZMIGIELSKI, S., PRÉVOST, G., MONTEIL, H. *et al.* **Leukocidal toxins of staphylococci**. Zentralbl. Bakteriol. 289,185-201. 1999.

TALAN, D. A.; KRISHNADASAN, A.; GORWITZ, R. J. *et al.* **Comparison of *Staphylococcus aureus* from skin and soft-tissue infections in US emergency department patients, 2004 and 2008**. Clin. Infect. Dis. 53, 144. 2011.

TARO M.; SHIRO J.; TAKUTO O. *et al.* **Infection mechanism of biofilm-forming *Staphylococcus aureus* on indwelling foreing materials in mice**. International Wound Journal. 12(2): 122-31. 2013.

TAVARES, Walter. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfecciosos**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, 2002. Cap 1: Classificação dos antimicrobianos. Cap 5: Resistência bacteriana.

________. MARINHO, Luiz A. C. **Rotinas de diagnósticos e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, 2012. 914-924 p.

THONDEL, M.; KAVANAUGH, J. S.; FLACK, C. E. *et al.* **Peptide signaling in the Staphylococci**. Chem. Rev. 111(1): 117-151. 2011.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS (FCM-UNICAMP). **Departamento de Anatomia Patológica**. Faculdade de Ciências Médicas. Site didático. Hospedado no Centro de Computação da UNICAMP em um servidor exclusivo e próprio do Departamento. Disponível em: http://anatpat.unicamp.br. Acesso em: 22 de Abril. 2015.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia Geral - **Setor de Patologia Geral**. Disponível em: https://patologia.iptsp.ufg.br/n/4920-baco-hiperplasia. Atualizado em: 21 agosto 2014, 11:43. Acesso em: 06 maio 2015, 05:08.

VANDENESCH, F.; NAIMI, T.; ENRIGHT, M. C. *et al.* **Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence**. Emerg. Infect. Dis. 9:978-984. 2003.

VELÁZQUEZ-MEZA, M. E. ***Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination**. Salud Publica Mex. 47: 381-387. 2005.

VOYICH, J. M.; OTTO, M.; MATHEMA, B. *et al.* **Is Panton-Valentine leukocidin the major virulence determinant in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease?** J. Infect. Dis. 194:1761-70. 2006.

VUONG, C.; SAENZ, H. L.; GÖTZ, F. *et al.* **Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus***. J. Infect. Dis. 182 1688-1693. 2000.

WARD, P. D.; TURNER, W. H. **Identification of staphylococcal Panton–Valentine leukocidin as a potent dermonecrotic toxin**. Infect Immun. 28:393-397. 1980.

WARDENBURG, J. B.; BAE, T.; OTTO, M. *et al.* **Poring over pores: α-hemolysin and Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* pneumonia**. Nat. Med. 13:1405-6. 2007.

_. PALAZZOLO-BALANCE, A. M.; OTTO, M. *et al.* **Panton-Valentine Leukocidin is not a virulence determinant in murine models of community- associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease**. The Journal of Infectious Diseases. 2008:198. 2008.

ANEXOS

ANEXO 01 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEUA)

Serviço Público Federal
Universidade Federal Fluminense
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Comissão de Ética no Uso de Animais

Certificamos que o projeto nº 439, intitulado "ESTUDO DA PATOGÊNESE DE INFECÇÕES CAUSADAS POR *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA (MRSA) EM MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE EM ROEDORES", sob a orientação do Prof. Dr. Fábio Aguiar Alves do Laboratório Universitário Rodolpho Albino, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal da SBCAL e obteve a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais em 13 de março de 2014. A quantidade total de animais aprovada pela CEUA para este projeto foi de 240 (duzentos e quarenta) camundongos, e este certificado é válido por três anos após sua aprovação.

Niterói, 13 de março de 2014.

Fabio Otero Ascoli

Prof. Dr. Fabio Otero Ascoli
Coordenador da CEUA

APÊNDICES

APÊNDICE 01 - ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO EM JANEIRO DE 2015.

International Research Journal of Microbiology (IRJM) (ISSN: 2141-5463) Vol. 6(1) pp. 6-11, January, 2015
Available online http://www.interesjournals.org/IRJM
DOI: http:/dx.doi.org/10.14303/irjm.2014.041

Full Length Research Paper

Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) cause dermonecrosis and bacteremia in rats

Giorgio Silva de Santana[1,2], Etyene Castro Dip[3], Fábio Aguiar-Alves[1,2,3*]

[1]Graduate Program in Pathology - Fluminense Federal University - Niterói - Brazil.
[2]Laboratory of Molecular Epidemiology and Biotechnology - Laboratory Universitário Rodolfo Albino – Fluminense Federal University - Niterói - Brazil.
[3]Fluminense Federal University – Polo Universitário de Nova Friburgo – Brazil.

*Corresponding Author's Email: faalves@vm.uff.br; Phone: +55 (21) 2629-9569

ABSTRACT

Inserting a contamitaned vascular catheter during the surgical procedure is a factor that might promote biofilm formation on the catheter, possibly leading to bacteremia. The use of experimental models to evaluate organic changes allows a better understanding of infectious processes of multiple organs. The aim of this study was to investigate the influence of methicillin resistance based on bacterial genetic differences in induced infection and subcutaneous catheter colonization, when comparing MRSA and MSSA infections outcomes. Subcutaneous infections with MRSA and MSSA bacterial suspension were performed in 15 Wistar rats divided into three groups as following: saline solution control group, MRSA and MSSA suspension at a 1 x 10^{5} CFU/mL for infection. Subcutaneous polyestilene catheters were surgically inserted into the skin of the animals before the infection. After 72 hours, subcutaneous implants, heart, spleen and kidneys were harvested and evaluated. The animals presented a typical auto resolutive case of bacteremia. The catheters and organs presented the same *S. aureus* isolate genotype as inoculated with evident biofilm formation. Our results showed both MRSA and MSSA bacteremia can compromise multiple organs within 72 hours of infection.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, bacteremia, infection, biofilm and animal model.

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus are Gram positive coccus commonly found colonizing skin and nasal cavities of healthy individuals (Cassettarri et al., 2005; Pereira, 2002; Koneman, et al., 2001). *S. aureus* has several features as virulence factors that supposedly contribute to its pathogenicity and its ability to colonize the host (Lutz et al., 2003; Michelim et al., 2005; Oliveira et al., 2001). Their virulence factors can be classified into three categories: (1) factors related to adherence to host cells or extracellular matrix like fibronectin, collagen, fibrinogen, coagulase; (2) factors related to evasion of host defense: staphylococci enterotoxin, toxic shock syndrome toxin (TSST), protein, lipase, and capsular polysaccharide types 1, 5 and 8; (3) factors related to invasion of host cell and tissue penetration as: Panton-Valentine leukocidin (PVL) (Diep and Otto, 2008) and alpha, beta, gamma and delta hemolysin toxins (Velazquez-Meza, 2005). Many factors contribute to the development of the disease complexity such as sepsis, endocarditis and necrotizing pneumonia, as patient's peculiarity, comorbidities, late diagnosis and treatment. The study of bacteria and its negative effects on the human organism is very important, since the understanding of how the secreted molecules by these microorganisms influence inflammatory processes are not totally elucidated.

Staphylococcus aureus infection enables the development of life threating diseases such as endocarditis and necrotizing pneumonia. Initially, bacteremia is the result of bacteria biofilm detachment within bloodstream followed by multiple organs infection and sepsis. The risk factors for bacteremia include advanced age, ongoing chemotherapy and invasive procedures (Lowy, 1998). Regarding organ infections, the worst prognosis is for the lung. Bacteria could have been introduced as pericarditis from an injured site, mainly caused by penetrating injury by the use of central venous catheter. In the case of the lungs, it may cause pneumonia resulting from aspiration and also osteomyelitis and septic arthritis (Weems, 2001).

Staphylococcus aureus carries a mobile genetic element, described as Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec), which contains determinants of antimicrobial resistance genes (Lowy, 1998; Ito et al., 2001). The multidrug-resistant MRSA is commonly found in hospital environments. In addition, antibiotic resistance β-lactam antibiotics, still have resistance to other classes of agents such as aminoglycosides (gentamicin), sulfamethoxazole/trimetoprim (SMZ-TMP), quinolones, tetracyclines, clindamycin and erythromycin. The resistance to many types of antimicrobial agents might be due to selective pressure imposed by usage, which classify these isolates as MRSA associated with the hospital environment (HA-MRSA, "Hospital-Associated MRSA") (Iain et al., 2003).

The transmission of *S. aureus* may occur through the handling of contaminated objects by health care professionals, runny nose, and especially in contact between individuals showing open infected wounds (Bradley, 1997). The ease of transmission makes the staphylococcal infections a difficult to treat and major problem in public health (Safdar and Maki, 2002).

MATERIALS AND METHODS

This study has been approved by the Committee of Ethics in Animal Experimentation from Fluminense Federal University, by the protocol number 439. Fifteen rats (Wistar) were randomly divided into three groups (table 1).

Bacterial samples used in the study were obtained from a collection of the laboratory of Molecular Epidemiology and Biotechnology - Fluminense Federal University. The colonies were grown in broth TSA (tripticase soy agar) for 24 hours, diluted in sterile saline (0.85% NaCl) at a concentration of 1×10^5 CFU/mL.

Surgical procedure

Animals were anesthetized by isoflurane inhalation under saturation (Forane® Abbott). The dorsal skin of rats were shaved and cleaned with 10% polyvinylpyrrolidone-iodine solution. The subcutaneous insertion of the polystyrene was made under the dorsal midline of each rat with 1.5 cm incision. Aseptically, a catheter fragment (Becton Dickinson-Arentina SRL), measuring 0.5 cm was deployed in sterile bag. Bacterial suspension at a 1×10^5 CFU/mL concentration (30 µL) was subsequently inoculated subcutaneously at one inch away from the catheter where the catheter was done, the control group was inoculated subcutaneously with sterile saline.

The bags were sealed with synthetic GLUBRAN® surgical Glue 2 (Sr GEM I-Italy). The animals returned to individual cages and were examined every six hours. After 72 hours of observation, the euthanasia of the animals was performed by an overdose of isoflurane anesthetic (Forane® Abbott). All catheter s, heart, spleen and left kidney were explanted for analysis.

Assessment of catheter colonization and bacteremia

Explanted organs, heart, spleen and kidney were harvested macerated were harvested from the five animals of each group, macerated in esteril saline solution and the extract was transferred to a sterile microtube and homogenized. A fraction of 100 µL of the suspension was plated onto blood agar medium. The catheter s were explanted and grown directly onto blood agar plates. All samples were cultured for 24 hours at 37°C. The colonies that showed hemolysis halo were subject to tests for *S. aureus* identification.

Phenotypic methods for *S. aureus* Identification

The samples were plated onto mannitol salt agar, subjected to catalase and coagulase tests. The positive samples were cultured for antimicrobial susceptibility using oxacillin and cefoxitin disks (CLSI, 2012) and genotypic analysis to detect the presence of mecA gene, using DNA extraction method described by Aguiar-Alves et al. (2006) and polymerase chain reaction, as described by Oliveira and Lencastre (2002).

RESULTS AND DISCUSSION

None of the animals died after 72 hours of infection or have had clinical signs of infection, as fever, weight loss, dehydration or any behavioral change. Groups inoculated with both *S. aureus* strains presented a swelling in the area of insertion of the catheter, with skin color change from red to purple, as well as local detachment of the layers of the epidermis (dermonecrosis) (Figure 1).

The animals in the control groups did not present any colonization at the site of the catheter insertion, contrary to what was observed in MRSA and MSSA groups. The catheters plated onto blood agar also showed a sick layer of bacterial growth (Figure 2).

Table 1. Number of rats for each groups

Study design.		
Groups	Inoculum 1 x 10^8 CFU/mL	N
MRSA	*mecA* +	5
MSSA	*mecA* -	5
Control	Sterile saline	5

The study was divided into three groups, each containing five animals, the control group inoculated with saline saterile group inoculated with MRSA bacterial strain Methicillin-resistant *S. aureus* and MSSA group inoculated with strain sensitive to methicillin. The bacterial concentration was inoculated 1 x 10^8 CFU / ml.

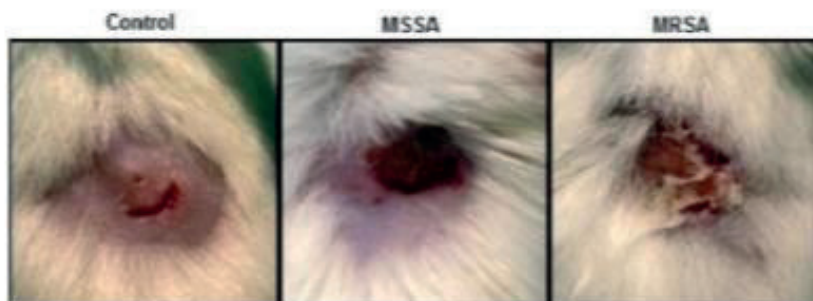



Figure 1. Rats dorsal region of each group (control, MSSA, MRSA). The images show the place where the catheter's fragments were inserted and the skin damage associated to it, after 72 hours of infection.

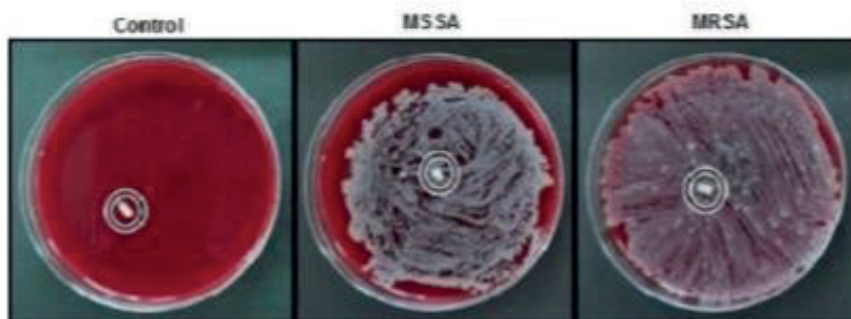



Figure 2. The images show the harvested catheter's fragments of each group (control, MSSA, MRSA). The catheters were incubated at 37°C onto blood agar plate. The open circles show the catheter's fragments and the colonies formation after overnight incubation.

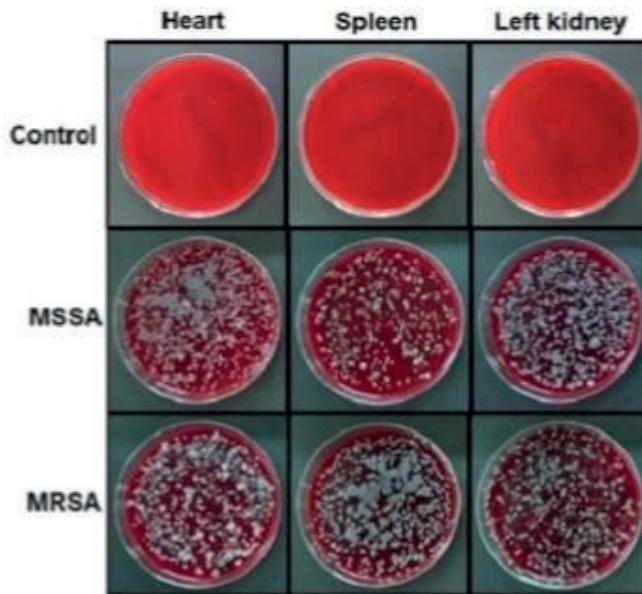



Figure 3. Heart, spleen and the left kidney were harvested from each group (control, MSSA, MRSA). The images show the colonies formation after 24 hours of incubation at 37°C onto blood agar plate after 72 hours of infection. The images show the colonies formation after 24 hours of incubation at 37°C.

Colonies were identified as MRSA and MSSA by sensitivity to antimicrobial susceptibility test for metticillin and cefoxitin, as well as the presence of mecA gene by PCR tests, respectively. The presence of MRSA strains on catheters confirmed its participation in biofilm formation. (Table 2; Figure 4).

Organ extracts of animals infected by MSSA and MRSA groups presented the development of bacteremia by presence of colonies in blood agar plates (Figures 3 and 4).

In this study, we observed that the formation of the catheter allowed biofilm bacteremia by inoculation of *S. aureus* in rats dorsal skin. This species were chosen because of its close correlation to humans inflammatory reactions to infections. Current studies show that sepsis is the leading cause of acute renal failure in hospitalized patients in recent years. Its incidence is approximately 19% in septic patients, 23% in patients with severe sepsis and 15% of hospitalized patients with septic shock, compromising multiple organs and systems (Lima et al., 2011).

Sepsis after infection of catheters has been mentioned as one of the main complications in vascular surgery. Vascular catheters are susceptible to infection by direct contamination during surgery procedures. Methicillin-resistant *S. aureus* has been mentioned as a major problem in cardiovascular surgical units' contamination during catheter insertion (Antonios et al., 2006; Earnshaw, 2002).

Limitations of this study were observed on the attempt to keep animals in control group free of contamination by other microorganisms, different from *S. aureus*. A second limitation was shown to be not using the ELISA method for the identification of specific antibodies in these animals which identify an anticipated settlement, prior to the beginning of the study. No difference in colonization with MSSA and MRSA was observed with the methodology used, possibly a change in inoculum preparation allow a change in the expression of results.

According to the type of material used to make the catheter s, its adherence to microorganisms can be increased, which may cause biofilm formation. It was

Table 2. Identification of *S. aureus* species after 72 hours challenge

Groups	Inoculum	Material extracted for analysis	Number of colonies *S. aureus* found (CFU)
MRSA	mecA +	Catheter	>1000
		Heart	>1000
		Spleen	>1000
		Left kidney	>1000
MSSA	mecA -	Catheter	>1000
		Heart	>1000
		Spleen	462
		Left kidney	>1000
Control	Sterile saline	Catheter	0
		Heart	0
		Spleen	0
		Left kidney	0

In the group MRSA strains carrying the mecA gene colonized organs, heart, spleen, left kidney and the catheter inserted subcutaneously into the back of the animals with a quantity > 1000 CFU. A similar result was observed in the group inoculated with MSSA strains do not carry the mecA gene. What was different in the control group where no catheter colonization and organs.

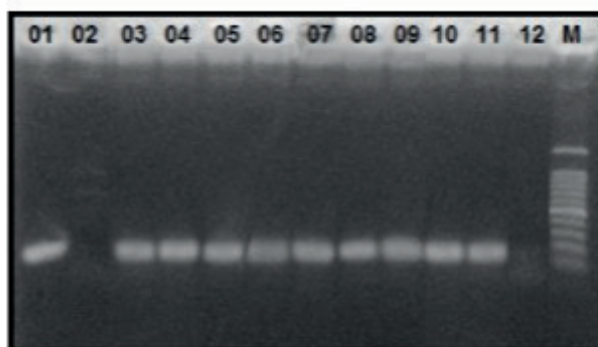



Figure 4. Result of Polymerase Chain Reaction Test and electrophoresis on agarose gel 1% for detection of the mecA gene in samples of *S. aureus* - lane 01: positive control; lane 02: negative control; lane 03 and 04: isolates from catheter; lane 05, 06 and 07: isolates from cardiac tissue; lane 08 and 09: isolates from spleen; lane: 10 and 11: Isolated samples of the left kidney; lane 12: reagents used for amplification of the mecA gene; lane M: molecular weight marker (100 bp) DNA ladder.

possible to observe the above-mentioned microorganisms forming biofilms. For these factors, antibiotic prophylaxis can be used to prevent such infections, however many of them, such as *S. aureus* can present beta lactam resistance, which will make imperative the use of a broad spectrum of antimicrobial profilaxys. The observation of organs infected by the inoculated *S. aureus* strain confirmed that this model is suitable for the study of this type of infection and biofilm formation method to study the pathogenesis of staphylococcal infections. More studies need to be performed to elucidate the different steps in the biofilm formation and sepsis by *S. aureus*.

ACKNOWLEDGMENT

We would like to thank FOPESQ-UFF (Fluminense Federal University), Pathology Graduation Program and FAPERJ for financial support to develop this project.

REFERENCES

Aguiar-Alves F, Medeiros F, Fernandes O, Gudziki Pereira RM, Perdreau-Remington F, Riley LW (2006). New *Staphylococcus aureus* genotyping method based on exotoxin (set) genes. J. Clin. Microbiol. 44 (8): 2728-32.

Antonios VS, Noel A, The Abstract, JM, Wilson WR, Mandrekar JN, W Harmsens (2006). Prosthetic vascular catheter infection: a risk factor analysis using a case-control study. J. Infect, 53 (1): 49-55.

Bradley SF (1997). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in nursing homes. Epidemiology, prevention and management. Drugs Aging. 10: 185-198.

Cassettari VC, Strabelli T, Medeiros EAS (2005). *Staphylococcus aureus* bacteremia: What is the impact of oxacillin resistance on mortality? Brazil. J. Infect. Diseases, vol. 9, N° 1, p. 70-76.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. CLSI document M100-S21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; (2012).

Diep An Binh and Michael Otto (2008). The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis; Elsevier Ltd, vol. 16; N° 8.

Earnshaw JJ (2002). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: vascular surgeons should fight back. Eur. J. Vasc Endovasc Surg, 24 (4): 283-286.

Iain BG, Stephen AN, Joanne LM, Lorna AF, Clarence JF (2003). Detection of intrinsic oxacillin resistance in non-multiresistant, oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (NORSA). J. Antimicrob Chemother. 51: 468-470.

Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, Hiramatsu K (2001). Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 45: 1323-1336.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schereckenberger PC, Win WC Jr (2001). Microbiological Diagnosis, 5th Edition: Guanabara Koogan: chap. 11: Gram-positive Coccus: part I: Staphylococci and Related Microorganisms.

Lima JBA, Skare TL, Malafaia T, Ribas-Son JM, Michaelis T, Ribas FM, Macedo RAC (2011). Inducing Sepsis syndrome of multiple organ dysfunction: an experimental study in rats. ABCD Arq Bras Cir Dig, 24 (1): 95-102.

Lowy FD (1998). *Staphylococcus aureus* infections. N. Engl. J. Med. 339: 520-532.

Lutz L, Machado A, Kuplich N, Barth AL (2003). Clinical failure of Vancomycin treatment of *Staphylococcus aureus* infection in atertiary care hospital in southern Brazil. The Brazil. J. Infect. Diseases. 7 (3): 224-228.

Michelim L, Lahude M, Ahmad PR (2005). Pathogenicity factors and antimicrobial resistance in *Staphylococcus epidermidis* associated with nosocomial infections in intensive care units. Braz. J. Microbiol. Vol. 36, no. 1, p. 17-23.

Oliveira DC, Lancaster H (2002). Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 46 (7): 2155-2161.

Oliveira GA, Okada, Genta RS, Mamizuka EM (2001). Evaluation of tolerance to Vancomycin in 365 hospital strains of *Staphylococcus aureus* resistant to Oxacillin. Brazil. J. Pathol. V 37; Nthe 4; P. 239-246.

Pereira MSV (2002). *Staphylococcus aureus*: the microvilão of resistance to antibiotics. On Line.

http://www.biologianaweb/biomural/divulga/staph/socorro1.htm, accessed on 13 February 2013.

Safdar N, Bradley EA (2008). The risk of infection after nasal colonization with *Staphylococcus aureus*. Am. J. Med. 121 (4): 310-315.

Schuenck RP, Pereira EM, Iorio NL (2008). Multiplex PCR assay to identify methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. FEMS Immunol Med Microbiol. 52 (3): 431-435.

Velázquez-Meza ME (2005). *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination. Salud Publica Mex. 47: 381-387.

Weems JJ Jr, Steinberg JP†, Filler S, Baddley JW, Corey GR, Sampathkumar P, Winston L, John JF, Kubin CJ, Talwani R, Moore T‡, Patti JM, Hetherington S, Texter M, Wenzel E, Kelley VA, Fowler VG Jr (2006). Phase II, randomized, double-blind, multicenter study comparing the safety and pharmacokinetics of Tefibazumab to placebo for treatment of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Antimicrob Agents Chemother 50: 2751-2755.

Wood MJ (2000). Comparative safety of vancomycin and teicoplanin control set. J Chemother. 12 (5): 21-25.

APÊNDICE 02 - ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO EM JUNHO DE 2015.

Journal of Global Biosciences
ISSN 2320-1355
Volume 4, Number 5, 2015, pp. 2092-2107
Website: www.mutagens.co.in
E-mail: submit@mutagens.co.in
researchsubmission@hotmail.com

Research Paper

Staphylococcus aureus BIOFILM DEVELOPMENT: THE URGENT NEED FOR TREATMENT ALTERNATIVES

Silva-Santana G[1,2], Castro, H. C[1,3] Ferreira, B. L. A[3] and Aguiar-Alves, F[1,2]

[1]Programa de Pós-Graduação em Patologia - Faculdade de Medicina - Universidade Federal Fluminense - Niterói, RJ - Brasil

[2]Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia - Laboratório Universitário Rodolfo Albino - Universidade Federal Fluminense

[3]Laboratório de Antibióticos, Bioquímica e Modelagem Molecular (LABiEMol) - Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, Outeiro de São João Baptista, 24020-150, Niterói, RJ, Brazil.

Abstract

Biofilm formation is a serious chronic condition that varies depending on the environment, nutrients, characteristic of the pathogen and the host. It may allow bacteria to resistthe host immune system andthe antimicrobial agents used in the therapeutic treatment. There are different factors responsible for bacterial biofilm formation, including genes such as *agr* and *ica*ADBC, as well as proteins including the MSCRAMM complex (Microbial Surface Components that recognize molecules of adhesion of the matrix), involved in some of biofilm formation specific steps (attachment, cell-cell adhesion, proliferation and detachment). Biofilm formation is one of the causative factors of hospital infection by *S. aureus*, an important pathogen from the hospital. *S.aureus*is usually found in the normal flora of a healthy individual, however, this colonization is a risk factor for developing diseases related to biofilm formation, as infections of medical devices, endocarditis and others. Since the knowledge regarding mechanisms of biofilm formation facilitates the selection of a proper treatment, the rational use of antimicrobial agents, and the development of new therapies for infections related to biofilm-forming microorganisms is a special subject to be addressed. This review intends to explore about the main characteristics of *S. aureus*, including history, virulence factors, disease processes involved and treatment options for the biofilm related infections in the last few years to contribute for generating new treatment alternatives.

Key words: biofilm formation, *Staphylococcus aureus*, virulence factors, treatment.

INTRODUCTION

The genus *Staphylococcus* is formed by Gram-positive cocci with irregular shapes (e.g. bunch of grapes) releasing hydrogen peroxide in the presence of oxygen, characterized as catalase positive (Santoset al. 2007; Kateeteet al. 2010). This genus has 33 species, in which 17 can be isolatedfrom human biological specimens(Santoset al. 2007). *S.aureus* is the most pathogenic species of this genus. Its identification is performed by a combination of phenotypic tests

including catalase, coagulase and mannitol fermentation tests (Murrayet al. 2003; Kateeteet al. 2010).
The incidence of *S. aureus* found asymptomatically in humans is about 27% (Younget al. 2012)while the most prevalent sites are nostrils, armpits and perineum (Giarolaet al. 2012).
Staphylococcus aureus has specific virulence factors and adaptive capacity that allows it to survive at different environmental conditions. This bacterium is able to resist the human innate immunity and to acquire resistance mechanisms against several antimicrobials (Falordet al. 2011).

Some *S. aureus* strains are capable of forming biofilm, which is characterized as highly organized bacterial community embedded in a self-produced polymeric matrix(Wuet al. 2011). The ability to form biofilm confers resistance mechanisms to the bacteria and it is related to many chronic diseases. More than 80% of bacterial infections involve the formation of biofilm, when combined with biofilm bacteria increased in the 1000 times endurance and survival when compared to bacterial strains are not associated with biofilms(Karaoliset al. 2005; Falordet al. 2011; Yeagleyet al. 2012). Thus, it is of great importance to know the main features of biofilm formation, the pathological processes and virulence factors involved, as well as the treatment for *S. aureus* biofilm-related infections (Donelliet al. 2007; Falordet al. 2011).

The biofilm formation involves different steps including adhesion, colonization and development. At a certain density/growth level, the cells start to detach (planktonic state) and may cause a disseminated infection (Donelliet al. 2007) (Figure 1).

The treatment of biofilm-related infections is of great importance but mostly unsuccessful. The difficulty in penetrating into this complex bacterial community matrix and its evasion of the host innate immune system is associated with about 25% of deaths and is an aggravating factor in the length of stay and hospital costs worldwide (Donelliet al. 2007; Archeret al. 2011; Kiedrowskiet al. 2011).

In this review, it is reported the latest data about the main characteristics of *S. aureus*, including history, virulence factors, disease processes involved and treatment options for staphylococcal infections related to biofilm formation.

Staphylococcus aureus: general aspects

Staphylococcus aureus is one of the most prevalent pathogens in infections related to health care environment.Therefore, several studies have been conducted to increase the knowledge about the mechanisms of transmission and control dissemination. *S. aureus* transmission can occur via fomites, nasal secretions, contact with colonized health professionals and/or open lesions among infected patients (Archeret al. 2011; Koch et al. 2014).
In the early 1940, the use of penicillin in the antimicrobial therapy was promising but in 1942 the resistance was already detected at the hospitals (Hartman and Tomasz 1981;Deresinski 2005; Koch et al. 2014).
The gene that confers *S. aureus* resistance to penicillin and codes for the synthesis of beta-lactamase is *blaZ*. Beta-lactamase is an extracellular enzyme responsible for hydrolyzing penicillin beta-lactam ring, which is an essential part of this antibiotic biological activity(Rammelkamp and Maxon 1942; Koch et al. 2014).
Differently,*S. aureus* resistance to methicillin is defined by *mec*A gene that is inserted into the Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCC*mec*), present in all Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains (Mehndiratta and Bhalla 2012). There are eleven types of SCC*mec* described so far, and the SCC*mec* Type III and IV are the most prevalent in human infections in Brazil (Caboclo et al. 2012), currently five CA-MRSA clonal lineages were identified associated with epidemics: Pandemic (USA300, CC8), Midwest clone (USA400, CC1), European clone (CC80), clone Southwest-Pacific Oceania (CC30), the clone Pacific (CC59) (DIEP and OTTO, 2008; KARAUZUM et al, 2013).The classification of different types of SCCmec is made from the internal regions of the cassette, and molecular classification, these movable elements may carry other genes for resistance to various drugs, including sulfametoxazol-trimetoprim, doxycycline and rifampin, as well as others (Deresinski 2005; Rudkinet al. 2012).

The mecA gene encodes a protein with low affinity to beta-lactam called PBP2a, structurally modifying the protein responsible for membrane penicillin (PBP2) making Methicillin resistant *S. aureus*. The PBPs are membrane bound enzymes that catalyze the transpeptidation and trans glycosylation of peptidoglycans, the major bacterial wall component. Current literature describes MRSA resistance as a result of the lower affinity of PBP2a for beta-lactam, allowing the survival of these bacterial strains even in the presence of these antimicrobials (Rudkinet al. 2012). Thus, MRSA infections cause increased mortality (Hagihara et al. 2012), longer hospital stay and increased costs compared with infections caused by Methicillin Sensitive *S. aureus* (MSSA).

Risk factors associated with the bacteremia caused by MRSA include: age, where patients aged 61 or older are more susceptible (Souza and Figueired 2008), prolonged hospitalization, previous treatment with antibiotics, catheterization and nasogastric tube use(Butterlyet al. 2010; Dhand and Sakoulas 2012; Hagiharaet al. 2012; Rudkin et al. 2012).

A prospective study showed that colonization is a risk factor for post operative complications(Butterly et al. 2010). MRSA strains have spread around the world since the 1960 and resistant strains are no longer exclusive to the hospital environment (Hospital-Acquired Methicillin-Resistant *S. aureus* - HA-MRSA), being also isolated from community infections (Community-Acquired Methicillin-Resistant *S. aureus* - CA-MRSA) (Hagihara et al. 2012; Rudkinet al. 2012).

Genetic analysis of HA-MRSA and CA-MRSA revealed that HA-MRSA SCCmec take a larger (e. g. types I, II and III) allowing a greater amount of resistance genes as CA-MRSA usually carries a lower structure SCCmec type (e. g. types IV and V) with a smaller amount of antimicrobial resistance genes (Rudkin et al. 2012)(Rudkin et al. 2012). CA-MRSA strains are known to cause severe invasive infections (e.g. necrotizing fasciitis) and to be involved in chronic diseases such as endocarditis, osteomyelitis and foreign-body infections (Kiedrowskiet al. 2011).

Staphylococcus aureus and virulence factors

To establish an infection, the bacteria needs to express a variety of molecules that determine the pathogenicity, known as virulence factors (Konget al. 2006). The high difficulty in successfully treating MRSA infections classifies it as highly pathogenic or virulent (Rudkinet al. 2012). Studies that compared the virulence strains of staphylococci showed that HA-MRSA has more antimicrobial resistance genes whereas CA-MRSA and MSSA are more virulent than HA-MRSA (Rudkinet al. 2012).

There are toxins and factors that increase the virulence of *S. aureus* strains and are of great importance including: a) toxin A, b) esfoliatin, causing the scalded skin syndrome, c) enterotoxins that cause food poisoning and d) toxin Panton-Valentine Leucocidin (PVL), responsible for altering the permeability of membranes of leukocytes and macrophages(Otto 2010).

Staphylococcus aureus and biofilm formation

Biofilm formation is also a factor involved in the development of numerous staphylococcal infections (Karaolis et al. 2005; Koch et al. 2014). *S. aureus* and *S. epidermidis* are primarily related to biofilm associated staphylococcal infections (Otto 2010). *S. aureus* are capable of resisting to the mechanical stress, antimicrobial therapies and the innate immune system of the host, becoming a serious chronic condition when protected by the biofilm (Kiedrowski and Horswill 2011; Kiedrowski et al. 2011).

Staphylococcus aureus is the main causative agent of biofilm-forming infections on medical devices such as orthopedic implants, ventilators, intravenous catheters, heart valves, pacemakers and vacuums. Periodontitis and peri-implant diseases that cause wounds (e.g. foot and pressure ulcers, diabetes), chronic endocarditis, eye infections (conjunctivitis, keratitis), osteomyelitis sepsis syndromes and metastatic infections are mostly derived from biofilm-forming strains (Otto 2010; Archer et al. 2011; Yeagley et al. 2012; Koch et al. 2014).

The biofilm is initially formed by a monolayer of bacteria that attaches and accumulates, generating a bacteria-containing polymeric matrix and extracellular slime on a solid surface

(Atshan et al. 2012; Linet al. 2012; Revdiwalaet al. 2012). When a microorganism infects a medical device, numerous variables determine biofilm formation. First, the microorganism must adhere to the exposed device surface long enough to make an irreversible binding. Then, the microorganism binding rate is determined by both number and types of the cells present in the fluid that pass through the device. The characteristics of surface physical chemistry is also an important factor for the biofilm formation (Revdiwalaet al. 2012).

The biofilm formation includes 1) determination, 2) cell-cell adhesion and 3) post regulated formation of biofilm mediated by genes such as a*gr*, *ica*ADBC, and adhesin proteins(O'Gara 2007).

The *ica*ADBC genes on the genome of the cell and the hoisting gene (regulator genes) form a single operon(Cramtonet al. 1999; Gotz 2002; Archeret al. 2011). The presence and expression of operon *ica* encoding enzymes is necessary for the production of Intercellular Polysaccharide Adhesin (PIA) also calledPoly-N-Acetyl Glucosamine (PNAG). Those are essential for cell-cell adhesion and biofilm formation in some strains (O'Gara 2007; Atshanet al. 2012). Additional surface proteins are also necessary for biofilm formation and fixing (Atshanet al. 2012; Linet al. 2012; Pozziet al. 2012).

Expression of gene *icaR* encodes a transcriptional repressor that negatively regulates the production of PIA (Cramtonet al. 1999; Gotz 2002). Importantly, the anoxia increases the transcription of operon *ica* consequently increasing PIA production by *S. aureus* and *S. epidermidis* strains (Archeret al. 2011). Proteins IcaA, C and D are membrane proteins whereas icaB is located in the extracellular matrix. The isolated icaA shows less activity when co-expressed with *icaD*. The *icaAD*acts as a new combination of enzymes that can facilitate the connection between icaC and icaA. Co-expression of icaAC reacts with specific PIA present in the medium whereas icaAC may be related to the translocation of plasma membrane polysaccharides as this protein activation is essential for biofilm formation (Gotz 2002) (Figure 2A).

Intercellular Polysaccharide Adhesin is an essential component for the formation of biofilm in some strains (Kiedrowskiet al. 2011). Some authors reported that MSSA strains depend on PIAorPNAG while others suggested that MRSA strains are more favorable to biofilm formation, independent of PIA (O'Neillet al. 2007). These authors reported the expression of the phenotype FnBPA / B e Alt, suggesting a relationship of beta-lactams and biofilm (Archeret al. 2011; Pozziet al. 2012). MRSA strains depend on fibronectin-binding proteins A and B (FnBPA and FnBPB) and autolisin (Atl). The Atl presents an autolytic activity and releases extracellular DNA. It can also adhere to the polymer surface, which is related to the phase of initial adherence of biofilm development (Cramtonet al. 1999; Gotz 2002; Pozziet al. 2012) and also binds to fibronectin demonstrating a relationship with later stages of biofilm formation and adhesion (Cramtonet al. 1999).

Staphylococcus aureus strains are particularly capable of adhering to, not just medical devices, but also a wide variety of extracellular matrix components, host components in infectious diseases, heart tissue, cartilage and chronic wounds for initial colonization. When a medical device is implanted, it is quickly covered by the host matrix proteins such as fibronectin, fibrinogen and collagen. *S. aureus* presents adhesins that are frequently covalently linked to peptidoglicans, present in the cell wall. These proteins belong to the family of Microbial Surface Components that recognize molecules of adhesion of the matrix (MSCRAMM) and bind to host proteins, colonizing it (Gotz 2002; Archeret al. 2011; Kiedrowskiet al. 2011). Thefibrinogen proteins A and B (FnBPA and FnBPB), collagen binding protein (Cna), binding and agglomeration fibrinogen proteins A and B (ClfA and ClfB) belong to this MSCRAMM family (Gotz 2002). *S. aureus* produces multiple extracellular proteases with self-cleavage activity that can separate the cells from surfaces, reinforcing the hypothesis of a protein based matrix existence (Kiedrowskiet al. 2011). Other proteins are also important and participate in the synthesis of staphylococcal biofilms, including surface proteins (SSP1) and biofilm-associated proteins (BAP) (Gotz 2002).

***Staphylococcus aureus* and quorum-sensing (QS)**

Gram-positive and Gram-negative bacteria evolve and become capable of synthesize signaling molecules called auto inducers peptides (AIP). During the bacteria growth, signaling molecules accumulate in the extracellular medium and reach a specific cell density or "quorum" able to activate a regulatory cascade that controls a particular type of cellular process. This phenomenon named *quorum sensing* is a regulatory system capable of inducing these AIP for communication among cells(Konget al. 2006; O'Gara 2007; Thoendelet al. 2011). *S. aureus* has two *quorum sensing* systems, *LuxS* and *Agr*, involved in biofilm formation (Konget al. 2006). The *Agr* from *S. aureus* and *S. epidermidis* controls the expression of several toxins and virulence factors and interacts with the innate immune system (Konget al. 2006).

The function of locus *agr* during the infection by Gram positive microorganism is controversial. *Agr* activation is not favorable for biofilm formation and virulence. Instead, it reduces the virulence and the ability to form biofilm (Shirtliffet al. 2002; Konget al. 2006). The locus *agr* negatively regulates genes associated with cell wall adhesion factors, leading to a lower adhesion, indirectly reducing biofilm formation and favoring the deployment of these cells, so that they return to the planktonic state (Santoset al. 2007). The quorum-sensing *agr* system is related to the ability of *S. aureus* to colonize other sites in the host. The *agr* gene increases the detachment of the biofilm, while the *luxS* gene reduces the ability of cell-cell interaction via down-regulation and expression of polysaccharides essential for biofilm development (Konget al. 2006; Kuehlet al. 2009; Tsujiet al. 2011).

The gene *agr* is located in *S. aureus* chromosome and its locus has two different transcripts, RNAII and RNAIII. The transcription of RNAII is an operon of four genes (*agr*B, *agr*D, *agr*C and *agr*A) that encodes factors for the synthesis of AIP (Konget al. 2006; Thoendelet al. 2011) (Figure 3).

The gene is the *agrD* promotes the production of PAI *agrB* while the developer is essential in the biosynthesis of AIP (Thoendel et al. 2011). Inducing self molecules bind to membrane through agrC protein, activating it. The agrC kinase acts as a sensor for adjustment of the two component system. The active agrC regulates activation agrAwhich in turn induces transcription of RNAII and RNAIII. The agrA is a DNA binding protein RNAIII while the effector molecule is in regulating the AGR system (Kong et al., 2006).

Since a) biofilm-forming bacteria strains are protected against the host immune system and antimicrobial treatment and b) the detachment of biofilm cells can generate colonization at other sites and an acute infection, the understanding of biofilm formation and proper treatment to avoid it is essential. The *quorum sensing* control systems in staphylococci are important and represent promising targets for the development of new antimicrobial that should be more explored by further research (Gotz 2002; Davies 2003; Konget al. 2006).

***Staphylococcus aureus*: infection treatment**

The treatment for bacterial infections should be as rational as possible. Thus, it is necessary to perform a pharmaceutical care whereas the therapy selection should be based on laboratorial tests involving pathogen identification and phenotypic resistance assays (Lunaet al. 2010). Errors in antimicrobials prescription are associated with increased mortality and morbidity. The unnecessary use of the antibiotics and the long course periods are factors that increase the cost of hospitalization and the prevalence of resistant organisms. Thus the rational use of antimicrobials allows improving prognosis of patients, generating benefits and reducing costs (Lunaet al. 2010).For the treatment of infections with HA-MRSA and CA-MRSA has been glycopeptidevancomycin common approach for the treatment of staphylococcal infections. However, the use of incorrect antibiotic medium led to the appearance of various strains with reduced susceptibility to vancomycin (Koch et al. 2014). These strains are referred to as vancomycin intermediate *S. aureus* (VISA), although its level is moderate resistance (MIC = 4-8 μg / ml) compared to the vancomycin-resistant strains (VRSA) (MIC ≥ 16 mg / ml), *S. aureus* resistant strains pose a great threat for the treatment of staphylococcal infections (Howden et al, 2010;. Koch et al. 2014)

Treatment biofilm-associated infections

The most effective treatment for biofilm related diseases is a surgical debridement, drainage and cleaning of infected site as well as the medical implant removal (Archeret al. 2011). However, in many cases, the removal is not feasible as in joint prosthetics or among patients that do not withstand a surgical process (Donelliet al. 2007).

Currently, the antimicrobial therapy alone is not successful, but associated with surgery, when possible. Medical doctors should also take into account drug interactions and adverse events in this process. Beta-lactam agents (e.g. penicillin G, oxacillin) are often used for treatment of susceptible strains (plasma concentration= 4x MIC). In cases of drug resistance or missing options, the aminoglycosides (vancomycin) are used, being considered their nephrotoxic effects (Archeret al. 2011; Kiedrowskiet al. 2011).

Linezolid or daptomycin are current alternatives for the treatment of biofilm-associated infections by MRSA (Archeret al. 2011; Kiedrowskiet al. 2011). Tetracyclines perform efficiency when used as pretreatment. Patients that used catheters coated with minocycline rifampin did not develop associated bloodstream infections when compared to the non-pretreated group. In a murine model of endocarditis associated with biofilm, tigecycline was more effective than vancomycin. However, despite the promising effects in the treatment of endocarditis and osteomyelitis, tigecycline has not been approved for the treatment of biofilm-associated infection (Kiedrowskiet al. 2011).

Due to the difficulty on treating infections and on limiting biofilm forming strains, new studies are being conducted to launch new prototypes antimicrobials to treat such infections and increase the current therapeutic options.The c-di-GMP activity was observed as to prevent cell-cell adhesion among *S. aureus*, one of the basic stages of biofilm formation (Karaolis et al. 2005).

Donelli et al. (2007) reported that Actinobacillusactinomycetemcomitans produces β-N-acetylglucosaminidase soluble call dispersin B (DspB) capable of dispersing mature biofilm produced by Staphylococcus epidermidis and other bacterial species, such as an alternative for interfering with quorum sensing devices analyzing phenomena doctors. They showed that dispersin B reduced the number of colony forming units (CFU) on devices previously treated when combined with an antimicrobial agent. However, the polymers treated with the antibiotic for prophylactic showed no activity.

Steven et al.(Rogerset al. 2010) described the antibiofilm activity of carbamate derivatives clinically relevant for different strains including MRSA. Novel N-ethyl-carbamate were synthesized varying the aromatic grouping, by adding triazol groups, indane, tetrahydroquinoline, indoline, pyridine, *para*-amino, *para*-methoxi methyl carbamate and bromine substitution in the ring.

Interestingly, the compounds *para*-amino, pyridine and indole (200mM) showed 90% inhibition of MRSA biofilm formation, whereas triazoles, pyridine and substituted indole inhibited *E. coli* biofilm formation (80%). The most potent inhibitor containing methyl-carbamate was promising to inhibit biofilm formation but not to destroy it. Thus it can be used in non-therapeutic and prophylactic treatments (Rogerset al. 2010).

In another study, Steven et al.(Rogerset al. 2010) evaluated the synergistic effect of a new 2-aminoimidazol/triazol compound and Novobiocin, an antibiotic used to treat infections of medical devices by *S. aureus* and *S. epidermidis*. The study suggested that the new agent retained the bacterial cells at the planktonic state while the antibiotic eliminated the bacterial population, including MRSA strains. The association presented favorable results compared to the compound alone.

Another study with the compound 2-aminoimidazol/triazol (2-AI) also demonstrated that the radical groups containing 2-AI were also capable of dispersing the bacterial biofilm of MRSA strains also suppressing the resistance against penicillin G, methicillin and oxacillin, acting similarly to those derived from the study of Steven et al.(Rogerset al. 2010; Yeagleyet al. 2012).

Some new classes of compounds including lactones, brominated furanones, phenethyl, 2-carbamate have been evaluated, showing activity against biofilm formation. Structural analogs of 2-aminopyrimidine inhibited biofilm formation by MRSA and MSSA strains (80.1 to 88.5% reduction in biofilms) also suppressing the resistance to antimicrobials. These derivatives may

be promising when used in association with existing drugs in the market such assulbactam(Lindseyet al. 2012).

Recently,13thiol bismuth derivatives were evaluated and three reached higher antibiofilm activity against MRSA and *P. aeruginosa*. In comparison, ampicillin, menocicline, vancomycin, rifampicin and daptomycin were tested for MRSA and mostly were completely ineffective, except for rifampicin (MIC = 100μg/mL) (Folsomet al. 2011).

In 2012, Cobradoet al.(Cobradoet al. 2012) evaluated the antibiofilm activity of cerium nitrate, low molecular weight chitosan and hamamelitannin. The Hamamelitannin decreased *S. aureus* biofilm formation whereas cerium nitrate reduced fungal biofilm and chitosan decreased metabolic activity of *S. epidermidis*. Indole derivatives also significantly reduced biofilm formation by *S. aureus* and *S. epidermidis* (Leeet al. 2012).

Cinnamaldehyde can inhibit the growth of MRSA biofilm in a dose-dependent way *sar*A(Jiaet al. 2011). Derivatives of antraquinones reduce *Streptococcus mutans*biofilm formation through plasma membrane disturbance (Coenyeet al. 2007). Derived thimoquinonic demonstrated bactericide activity and has inhibited *S. aureus* ATCC 25923 and *S. epidermidis* biofilm formation(Chaiebet al. 2011). Interestingly, the antibiofilm activity of triazoles has also been demonstrated in other studies(Suet al. 2012).

Broad-spectrum antimicrobial activity was found in photodynamic therapy (PDT) for the treatment of infections related to bacterial biofilm of MRSA strains, *P. aeruginosa* and fungal infections. It appears effective to kill multi-drug resistance microbes, acting faster against microorganisms than antimicrobials, and there is no reported evidence for PDT resistant mechanisms. Many different types of photosensitizers and light sources have been studied. Methylene blue (MB) and other phenothiazines have been used as photosensitizer agents. Both kinds are active as strong oxidizers and cause cellular damage, membrane lysis and protein inactivation (Bielet al. 2011; Daiet al. 2012; Parket al. 2012; Biel et al. 2013). Bacteriophages or phages are viruses that specifically infect bacteria. There are DNA and lytic enzymes bacteriophages, both act on the cell wall (Fischetti 2008). Therapies with bacteriophages are also being studied, due to the action of specific bacteriophages not reaching the normal flora and proliferating at the site of infection. Studies report action including antimicrobial resistant strains to antimicrobials and biofilm formers (Burrowes et al. 2011; Chibeuet al. 2012; Gilmore 2012; Yilmazet al. 2013). But the use of this therapy requires further study since its pharmacodynamics remains unknown because it is a replication agent (Kirby 2012). Another study shows that bacteriophages can be an effective topical therapy against *S. aureus* biofilm-infected wounds in the setting of a deficient or disrupted biofilm structure. Associated treatment in order to disrupt the extracellular biofilm matrix, allowing for increased penetration of species-specific bacteriophages, represents a new and effective approach to chronic wound care and infection biofilm formation (Sethet al. 2013).

Studies with nanoparticles vary according to the substances used, but exhibit promising antimicrobial effect, also reducing biofilm infections related to surfaces, when pretreated with nanoparticles (Jonathanet al. 2012; Obermeier et al. 2012; Regielet al. 2013).

A vaccine development has been extensively studied but the main limitation is the identification of a selective antigen that mark the biofilm forming strains (Archeret al. 2011). Glucosamine, lipoprotein ABC transport protein, hipolitic conserved and conserved lipoprotein formed a tetravalent vaccine, which was analyzed against a staphylococcal biofilm-related infection. This study has used chronic osteomyelitis rabbit model revealing that the vaccination treatment associated with vancomycin reduces by 67 to 82% biofilm formation when compared to the group treated with vancomycin alone. The vaccination alone showed no significant reduction of biofilm. The association with vancomycin therapy reduced from 87.5% the biofilm MRSA strains. Currently, there is no effective vaccine against biofilm-forming strains and the expression and large number of virulence factors makes the discovery of protective antigens particularly difficult (Bradyet al. 2011).

FINAL CONSIDERATIONS

Staphylococcus aureus is an important pathogen associated with nosocomial infections and biofilm formation, being a serious chronic condition. Biofilm formation confers resistance against not only the host immune and innate system, but also against different antimicrobials on the market. This situation turned the search for new treatment approaches necessary. More studies are needed to understand the formation of biofilm as molecular targets.

Figure 1: Biofilm formation steps.

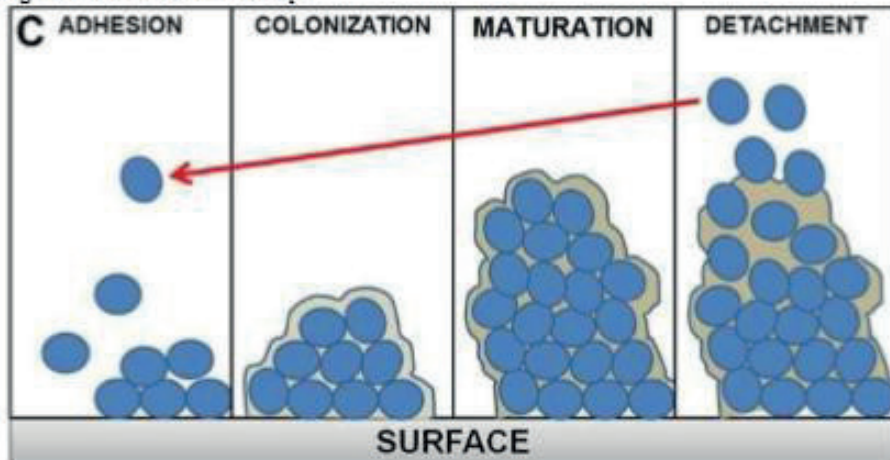



Figure 2: Outlining the activity of proteins icaADBC on biofilm-forming process (A) and mechanisms of *agr quorum sensing* (B). (A) Proteins involved in exopolysaccharide synthesis of PIA are complex genomic *ica*ADBC. Proteins icaA, icaC and icaD are transmembrane proteins and protein icaAB is located in the extracellular matrix. The first step in the synthesis of PIA is icaAD association will facilitate the export of PIA via membrane through association and activation of icaAC. Once in the extracellular matrix, PIA protein icaAB removes some N-acetyl groups, providing essential cationic character for attaching to surfaces.

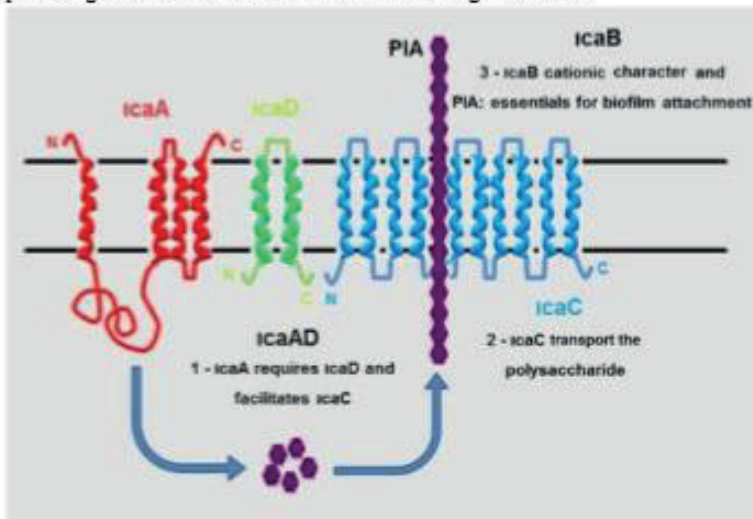
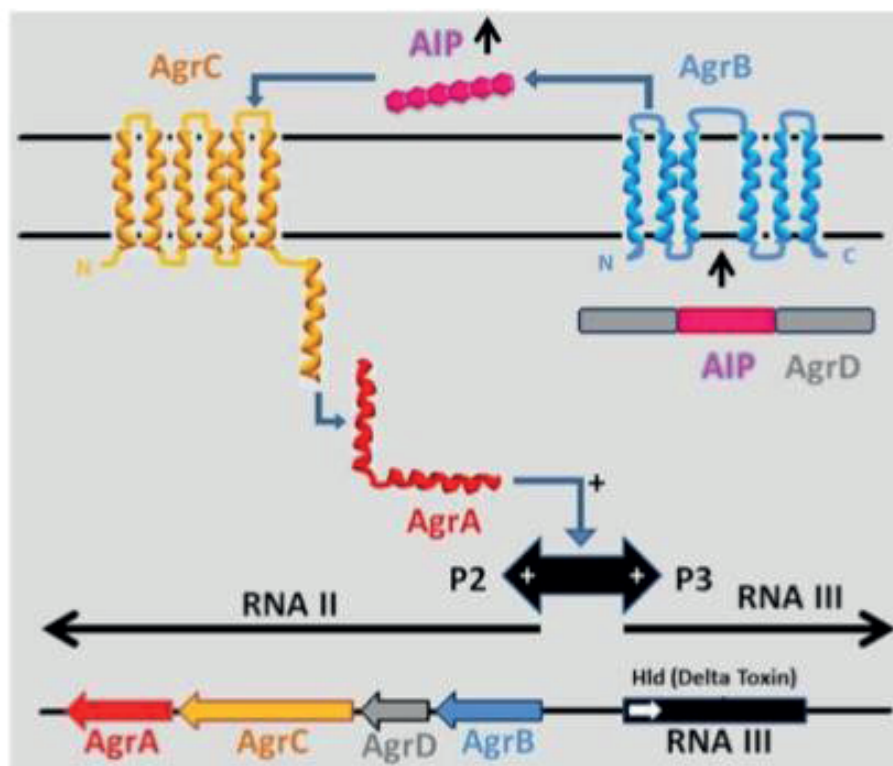



Figure 3: AgrD is a polypeptide chain and a precursor of auto inducer protein (AIP) that is exported outside the cell via AgrB. After reaching a threshold density, AIP binds to AgrC transmembrane receptors, which will phosphorylate AgrA and initiate agr transcription promoters. Active AgrA will induce transcription of RNAII and RNAIII. The transcription of RNAII contains four genes (*agrB, D, C* and *A*) important to the PIA synthesis in a positive feedback system. The RNAIII transcription is responsible for transcription of other phenotypes quorum (bacterial exotoxins).

ACKNOWLEDGEMENTS
We would like to thank FOPESQ-UFF (Fluminense Federal University), Pathology Graduation Program and FAPERJ for financial support to develop this study.

REFERENCES

Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME (2011) *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. Virulence 2(5): 445-459.

Atshan SS, Shamsudin MN, Thian Lung LT, Sekawi Z, Ghaznavi-Rad E and P. P. C (2012) Comparative characterisation of genotypically different clones of MRSA in the production of biofilms. J Biomed Biotechnol.Volume 2012, Article ID 417247, 7 pages doi:10.1155/2012/417247

Biel MA, Pedigo L, Gibbs A and LN (2013) Photodynamic therapy of antibiotic-resistant biofilms in a maxillary sinus model. Int Forum Allergy Rhinol. Jun;3(6):468-73. doi: 10.1002/alr.21134. Epub 2013 Jan 10.

Biel MA, Sievert C, Usacheva M, Teichert M, Balcom J (2011) Antimicrobial photodynamic therapy treatment of chronic recurrent sinusitis biofilms. International Forum of Allergy and Rhinology 1(5): 329-334.

Brady RA, O'May GA, Leid JG, Prior ML, Costerton JW, Shirtliff ME (2011) Resolution of *Staphylococcus aureus* Biofilm Infection Using Vaccination and Antibiotic Treatment. Infection and Immunity 79(4): 1797-1803.

Burrowes B, Harper DR, Anderson J, McConville M, Enright MC (2011) Bacteriophage therapy: potential uses in the control of antibiotic-resistant pathogens. Expert Rev Anti Infect 9(9): 775-785.

Butterly A, Schmidt U, Wiener-Kronish J (2010) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization, its relationship to nosocomial infection, and efficacy of control methods. Anesthesiology 113(6): 1453-1459.

Caboclo RM, Cavalcante FS, Pontes INL, Schuenck RP, Olendzki AN, Felix MJ, Chamon RC, Netto KRS (2012) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Rio de Janeiro hospitals: Dissemination of the USA400/ST1 and USA800/ST5 SCCmec type IV and USA100/ST5 SCCmec type II lineages in a public institution and polyclonal presence in a private one. Am J Infect Control 12: 1204-1207.

Chaieb K, Kouidhi B, Jrah H, Mahdouani K, Bakhrouf A (2011) Antibacterial activity of Thymoquinone, an active principle of Nigella sativa and its potency to prevent bacterial biofilm formation. BMC Complement Altern Med 11: 29.

Chibeu A, Lingohr EJ, Masson L, Manges A, Harel J, Ackermann H, Kropinski AM, Boerlin P (2012) Bacteriophages with the Ability to Degrade Uropathogenic Escherichia Coli Biofilms. Viruses 4(4): 471-487.

Cobrado L, Azevedo MM, Silva-Dias A, Pedro Ramos JP, Pina-Vaz C, Rodrigues AG (2012) Cerium, chitosan and hamamelitannin as novel biofilm inhibitors? J Antimicrob Chemother. May; 67(5):1159-62. doi: 10.1093/jac/dks007. Epub 2012 Feb 8.

Coenye T, Honraet K, Rigole P, Nadal Jimenez P, Nelis HJ (2007) In vitro inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation on hydroxyapatite by subinhibitory concentrations of anthraquinones. Antimicrob Agents Chemother 51(4): 1541-1544.

CramtonSE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Gotz F (1999) The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. Infect Immun 67(10): 5427-5433.

Dai T, Fuchs BB, Coleman JJ, Prates RA, Astrakas C, Denis TG, Ribeiro MS, Mylonakis E, Hamblin MR, Tegos GP (2012) Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. Front Microbiol. 3(120).

Davies D (2003) Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. Nat Rev Drug Discov 2(2): 114-122.

Deresinski S (2005) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. Clin Infect Dis 40(4): 562-573.

Dhand A, Sakoulas G (2012) Reduced vancomycin susceptibility among clinical *Staphylococcus aureus* isolates ('the MIC Creep'): implications for therapy. F1000 Medicine Reports 4: 4. doi: 10.3410/M4-4. Epub 2012 Feb 1

Diep, A. B.; Otto, M. The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis. Trends Microbiol. 16: 361-369. 2008.

Donelli G, Francolini I, Romoli D, Guaglianone E, Piozzi A, Ragunath C, Kaplan JB (2007) Synergistic Activity of Dispersin B and Cefamandole Nafate in Inhibition of Staphylococcal Biofilm Growth on Polyurethanes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 51(8): 2733-2740.

Falord M, Mader U, Hiron A, Debarbouille M, Msadek T (2011) Investigation of the *Staphylococcus aureus* GraSR regulon reveals novel links to virulence, stress response and cell wall signal transduction pathways. Plos One 6(7): 21323.

Fischetti VA (2008) Bacteriophage Lysins as Effective Antibacterials. Curr Opin Microbiol 11(5): 393-400.

Folsom JP, Baker B, Stewart PS (2011) In vitro efficacy of bismuth thiols against biofilms formed by bacteria isolated from human chronic wounds. Journal of Applied Microbiology 111: 989–996.

Giarola LB, Santos RR, Bedendo J, Junior WVS, Borelli SD (2012) HLA molecules and nasal carriage of *Staphylococcus aureus* isolated from dialysis and kidney transplant patients at a hospital in Southern Brazil. BMC Res Notes 5: 90.

Gilmore BF (2012) Bacteriophages as anti-infective agents: recent developments and regulatory challenges. Expert Rev. Anti Infect. Ther 10(5): 533-535.

Gotz F (2002) Staphylococcus and biofilms. Mol Microbiol 43(6): 1367-1378.

Hagihara M, Umemura T, Mori T, Mikamo H (2012) Daptomycin approved in Japan for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Ther Clin Risk Manag 8: 79-86.

Hartman Um, Tomasz B. proteínas de ligação à penicilina alterados em cepas resistentes à meticilina de *Staphylococcus aureus*. Agentes Antimicrob Chemother 1981; 19: 726 - 35.

Jia P, Xue YJ, Duan XJ, Shao SH (2011) Effect of cinnamaldehyde on biofilm formation and sarA expression by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lett Appl Microbiol 53(4): 409-416.

Lellouche J, Friedman A, Gedanken A, Banin E (2012) Antibacterial and antibiofilm properties of yttrium fluoride nanoparticles. Int J Nanomedicine 7: 5611-5624.

Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME (2011) Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. Virulence 2(5): 445-459.

Atshan SS, Shamsudin MN, Thian Lung LT, Sekawi Z, Ghaznavi-Rad E and P. P. C (2012) Comparative characterisation of genotypically different clones of MRSA in the production of biofilms. J Biomed Biotechnol. Volume 2012, Article ID 417247, 7 pages doi:10.1155/2012/417247

Biel MA, Pedigo L, Gibbs A and LN (2013) Photodynamic therapy of antibiotic-resistant biofilms in a maxillary sinus model. Int Forum Allergy Rhinol. Jun;3(6):468-73. doi: 10.1002/alr.21134. Epub 2013 Jan 10.

Biel MA, Sievert C, Usacheva M, Teichert M, Balcom J (2011) Antimicrobial photodynamic therapy treatment of chronic recurrent sinusitis biofilms. International Forum of Allergy and Rhinology 1(5): 329-334.

Brady RA, O'May GA, Leid JG, Prior ML, Costerton JW, Shirtliff ME (2011) Resolution of Staphylococcus aureus Biofilm Infection Using Vaccination and Antibiotic Treatment. Infection and Immunity 79(4): 1797-1803.

Burrowes B, Harper DR, Anderson J, McConville M, Enright MC (2011) Bacteriophage therapy: potential uses in the control of antibiotic-resistant pathogens. Expert Rev Anti Infect 9(9): 775-785.

Butterly A, Schmidt U, Wiener-Kronish J (2010) Methicillin-resistant Staphylococcus aureus colonization, its relationship to nosocomial infection, and efficacy of control methods. Anesthesiology 113(6): 1453-1459.

Caboclo RM, Cavalcante FS, Pontes INL, Schuenck RP, Olendzki AN, Felix MJ, Chamon RC, Netto KRS (2012) Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Rio de Janeiro hospitals: Dissemination of the USA400/ST1 and USA800/ST5 SCCmec type IV and USA100/ST5 SCCmec type II lineages in a public institution and polyclonal presence in a private one. Am J Infect Control 12: 1204-1207.

Chaieb K, Kouidhi B, Jrah H, Mahdouani K, Bakhrouf A (2011) Antibacterial activity of Thymoquinone, an active principle of Nigella sativa and its potency to prevent bacterial biofilm formation. BMC Complement Altern Med 11: 29.

Chibeu A, Lingohr EJ, Masson L, Manges A, Harel J, Ackermann H, Kropinski AM, Boerlin P (2012) Bacteriophages with the Ability to Degrade Uropathogenic Escherichia Coli Biofilms. Viruses 4(4): 471-487.

Cobrado L, Azevedo MM, Silva-Dias A, Pedro Ramos JP, Pina-Vaz C, Rodrigues AG (2012) Cerium, chitosan and hamamelitannin as novel biofilm inhibitors? J Antimicrob Chemother. May; 67(5):1159-62. doi: 10.1093/jac/dks007. Epub 2012 Feb 8.

Coenye T, Honraet K, Rigole P, Nadal Jimenez P, Nelis HJ (2007) In vitro inhibition of Streptococcus mutans biofilm formation on hydroxyapatite by subinhibitory concentrations of anthraquinones. Antimicrob Agents Chemother 51(4): 1541-1544.

Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Gotz F (1999) The intercellular adhesion (ica) locus is present in Staphylococcus aureus and is required for biofilm formation. Infect Immun 67(10): 5427-5433.

Dai T, Fuchs BB, Coleman JJ, Prates RA, Astrakas C, Denis TG, Ribeiro MS, Mylonakis E, Hamblin MR, Tegos GP (2012) Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. Front Microbiol. 3(120).

Davies D (2003) Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. Nat Rev Drug Discov 2(2): 114-122.

Deresinski S (2005) Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. Clin Infect Dis 40(4): 562-573.

Dhand A, Sakoulas G (2012) Reduced vancomycin susceptibility among clinical Staphylococcus aureus isolates ('the MIC Creep'): implications for therapy. F1000 Medicine Reports 4: 4. doi: 10.3410/M4-4. Epub 2012 Feb 1

DIEP, A. B.; OTTO, M. The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis. Trends Microbiol. 16: 361-369. 2008.

Donelli G, Francolini I, Romoli D, Guaglianone E, Piozzi A, Ragunath C, Kaplan JB (2007) Synergistic Activity of Dispersin B and Cefamandole Nafate in Inhibition of Staphylococcal Biofilm Growth on Polyurethanes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 51(8): 2733-2740.

Falord M, Mader U, Hiron A, Debarbouille M, Msadek T (2011) Investigation of the Staphylococcus aureus GraSR regulon reveals novel links to virulence, stress response and cell wall signal transduction pathways. Plos One 6(7): 21323.

Fischetti VA (2008) Bacteriophage Lysins as Effective Antibacterials. Curr Opin Microbiol 11(5): 393-400.

Folsom JP, Baker B, Stewart PS (2011) In vitro efficacy of bismuth thiols against biofilms formed by bacteria isolated from human chronic wounds. Journal of Applied Microbiology 111: 989–996.

Giarola LB, Santos RR, Bedendo J, Junior WVS, Borelli SD (2012) HLA molecules and nasal carriage of Staphylococcus aureus isolated from dialysis and kidney transplant patients at a hospital in Southern Brazil. BMC Res Notes 5: 90.

Gilmore BF (2012) Bacteriophages as anti-infective agents: recent developments and regulatory challenges. Expert Rev. Anti Infect. Ther 10(5): 533-535.

Gotz F (2002) Staphylococcus and biofilms. Mol Microbiol 43(6): 1367-1378.

Hartman Um, Tomasz B. proteínas de ligação à penicilina alterados em cepas resistentes à meticilina de Staphylococcus aureus. Agentes Antimicrob Chemother. 1981; 19: 726 - 35.

Howden BP, Davies JK, Johnson PDR, Stinear TP, Grayson ML. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. Clinical microbiology reviews. 2010; 23:99–139.

Jia P, Xue YJ, Duan XJ, Shao SH (2011) Effect of cinnamaldehyde on biofilm formation and sarA expression by methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Lett Appl Microbiol 53(4): 409-416.

Lellouche J, Friedman A, Gedanken A, Banin E (2012) Antibacterial and antibiofilm properties of yttrium fluoride nanoparticles. Int J Nanomedicine 7: 5611-5624.

Karaolis DKR, Rashid MH, Chythanya R, Luo W, Hyodo M, Hayakawa Y (2005) c-di-GMP (3'-5'-Cyclic Diguanylic Acid) Inhibits Staphylococcus aureus Cell-Cell Interactions and Biofilm Formation. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 49(3): 1029-1038.

Kateete DP, Kimani CN, Katabazi FA, Okeng A, Okee MS, Nanteza A, Joloba ML, Najjuka FC (2010) Identification of Staphylococcus aureus: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. Ann Clin Microbiol Antimicrob 9: 23.

Kiedrowski MR, Horswill AR (2011) New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1241(2011): 104-121.

Kiedrowski MR, Kavanaugh JS, Malone CL, Mootz JM, Voyich JM, Smeltzer MS, Bayles KW, Horswill AR (2011) Nuclease modulates biofilm formation in community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Plos One 6(11): 26714.

Kirby AE (2012) Synergistic Action of Gentamicin and Bacteriophage in a Continuous Culture Population of Staphylococcus aureus. PLoS One 7(11): e51017.

Kong KF, Vuong C, Otto M (2006) Staphylococcus quorum sensing in biofilm formation and infection. Int J Med Microbiol 296(2-3): 133-139.

Kuehl R, Al-Bataineh S, Gordon O, Luginbuehl R, Otto M, Textor M, Landmann R (2009) Furanone at subinhibitory concentrations enhances staphylococcal biofilm formation by luxS repression. Antimicrob Agents Chemother 53(10): 4159-4166.

Lee JH, Kim YG, Kim CJ, Lee JC, Cho MH, Lee J (2012) Indole-3-acetaldehyde from Rhodococcus sp. BFI 332 inhibits Escherichia coli O157:H7 biofilm formation. Appl Microbiol Biotechnol 96(4): 1071-1078.

Lin MH, Shu JC, Huang HY, Cheng YC (2012) Involvement of iron in biofilm formation by Staphylococcus aureus. Plos One 7(3): 34388.

Lindsey EA, Worthington RJ, Alcaraz CC, Melander C (2012) 2-Aminopyrimidine as a novel scaffold for biofilm modulation. Org. Biomol. Chem., 10: 2552.

Luna CM, Rodriguez-Noriega E, Bavestrello L, Gotuzzo E (2010) Treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) infections in Latin America. Rev Chilena Infectol 27(2): 94-103.

Mehndiratta PL, Bhalla P (2012) Typing of Methicillin resistant Staphylococcus aureus: a technical review. Indian J Med Microbiol 30(1): 16-23.

Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Yolken RH (2003) Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase-Positive Cocci that Grow Aerobically. ISBN: 978-0-323-08330-0; PII: B978-0-323-08330-0.00014-1; Author: Tille; 00014

O'Gara JP (2007) ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus. FEMS Microbiol Lett 270(2): 179-188.

O'Neill E, Pozzi C, Houston P, Smyth D, Humphreys H, Robinson AD, O'Gara JP (2007) Association between Methicillin Susceptibility and Biofilm Regulation in Staphylococcus aureus Isolates from Device-Related Infections. Journal of Clinical Microbiology 45(5): 1379-1388.

Obermeier A, Küchler S, Matl FD, Pirzer T, Stemberger A, Mykhaylyk O, Friess WBR (2012) Magnetic Drug Targeting as New Therapeutic Option for the Treatment of Biomaterial Infections. Journal of Biomaterials Science 23(18).

Otto M (2010) Looking toward basic science for potential drug discovery targets against communit-associated MRSA. Med Res Rev. 30(1): 1-22.

Park JH, Ahn MY, Kim YC, Kim SA, Moon YH, Ahn SG, Yoon JH (2012) In Vitro and in Vivo Antimicrobial Effect of Photodynamic Therapy Using a Highly Pure Chlorin e6 against Staphylococcus aureus Xen29. Biol Pharm Bull 35(4): 509-514.

Pozzi C, Waters E, Rudkin JK, Schaeffer CR, Lohan AJ, Tong P, Loftus BJ, Pier GB, Fey PD, Massey RC, O'Gara JP (2012) Methicillin Resistance Alters the Biofilm Phenotype and Attenuates Virulence in Staphylococcus aureus Device-Associated Infections. Plos Pathog 8(4): 1002626.

Rammelkamp CH, Maxon T (1942) Resistance of Staphylococcus aureus to the Action of Penicillin. Proc Roy Soc Exper Biol Med 51: 386-389.

Regiel A, Irusta S, Kyzioł A, Arruebo MSJ (2013) Preparation and characterization of chitosan-silver nanocomposite films and their antibacterial activity against Staphylococcus aureus. Nanotechnology 24(1).

Revdiwala S, Rajdev BM, Mulla S (2012) Characterization of Bacterial Etiologic Agents of Biofilm Formation in Medical Devices in Critical Care Setup. Critical Care Research and Practice 2012. Volume 2012 (2012), Article ID 945805, 6 pages. http://dx.doi.org/10.1155/2012/945805

Rogers SA, Huigens RW, Cavanagh J, Melander C (2010) Synergistic Effects between Conventional Antibiotics and 2-Aminoimidazole-Derived Antibiofilm Agents. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 54(5): 2112-2118.

Rogers SA, Whitehead DC, Mullikin T, Melander C (2010) Synthesis and bacterial biofilm inhibition studies of ethyl N-(2-phenethyl) carbamate derivatives. Org. Biomol. Chem. 8: 3857-3859.

Rudkin JK, Edwards AM, Bowden MG, Brown EL, Pozzi C, Waters EM, Chan WC, Williams P, O'Gara JP, Massey RC (2012) Methicillin resistance reduces the virulence of healthcare-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus by interfering with the agr quorum sensing system. J Infect Dis 205(5): 798-806.

Santos AL, Santos DO, Freitas CC, Ferreira BLA, Afonso IF, Rodrigues CR, Castro HC (2007) Staphylococcus aureus: visiting a strain of clinical importance. J Bras Patol Med Lab 43(6): 413-423.

Seth AK, Geringer MR, Nguyen KT, Agnew SP, Dumanian Z, Galiano RD, Leung KP, Mustoe TA, Hong SJ (2013) Bacteriophage Therapy for Staphylococcus aureus Biofilm-Infected Wounds: A New Approach to Chronic Wound Care. Plast Reconstr Surg 131(2): 225-234.

Shirtliff ME, Mader JT, Camper AK (2002) Molecular interactions in biofilms. Chem Biol 9(8): 859-871.

Souza LBGD, Figueired BDB (2008) Prevalência de Infecções Nosocomiais Provocadas por Staphylococcus aureus Resistente à Meticilina (M.R.S.A.), no Hospital Universitário Regional de Maringá. RBAC 40(1): 31-34.

Su Z, Yeagley AA, Su R, Peng L, Melander C (2012) Structural Studies on 4,5-Disubstituted 2-Aminoimidazole-Based Biofilm Modulators that Suppress Bacterial Resistance to beta-Lactams. ChemMedChem. Nov; 7(11):2030-9. doi: 10.1002/cmdc.201200350. Epub 2012 Sep 25.

Thoendel M, Kavanaugh JS, Flack CE, Horswill AR (2011) Peptide signaling in the staphylococci. Chem Rev 111(1): 117-151.

Tsuji BT, MacLean RD, Dresser LD, McGavin MJ, Simor AE (2011) Impact of accessory gene regulator (agr) dysfunction on vancomycin pharmacodynamics among Canadian community and health-care associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Ann Clin Microbiol Antimicrob 10: 20.

Wu X, Wang Y, Tao L (2011) Sulfhydryl compounds reduce Staphylococcus aureus biofilm formation by inhibiting PIA biosynthesis. FEMS Microbiol Lett 316(1): 44-50.

Yeagley AA, Su Z, McCullough KD, Worthington RJ, Melander C (2012) N-Substituted 2-aminoimidazole inhibitors of MRSA biofilm formation accessed through direct 1,3-bis(tert-butoxycarbonyl)guanidine cyclization. Org Biomol Chem 11: 130-137.

Yilmaz C, Colak M, Yilmaz BC, Ersoz G, Kutateladze M, Gozlugol M (2013) Bacteriophage Therapy in Implant-Related Infections: An Experimental Study. J Bone Joint Surg Am 95(2): 117-125.

Young BC, Golubchik T, Batty EM, Fung R, Larner-Svensson H, Votintseva AA, Miller RR, Godwin H, Knox K, Everitt RG, Iqbal Z, Rimmer AJ, Cule M, Ip CL, Didelot X, Harding RM, Donnelly P, Peto TE, Crook DW, Bowden R, Wilson DJ (2012) Evolutionary dynamics of Staphylococcus aureus during progression from carriage to disease. Proc Natl Acad Sci U S A 109(12): 4550-4555.

Karauzum, H.; Adhikari, R. P.; Sarwar, J. et al. Structurally designed attenuated subunit vaccines for S. aureus LukS-PV and LukF-PV confer protection in a mouse bacteremia model. PLoS ONE. 8(6): e65384. 2013.

Karaolis DKR, Rashid MH, Chythanya R, Luo W, Hyodo M, Hayakawa Y(2005) c-di-GMP (3'-5'-Cyclic Diguanylic Acid) Inhibits *Staphylococcus aureus* Cell-Cell Interactions and Biofilm Formation. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 49(3): 1029-1038.

Kateete DP, Kimani CN, Katabazi FA, Okeng A, Okee MS, Nanteza A, Joloba ML, Najjuka FC (2010) Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. Ann Clin Microbiol Antimicrob 9: 23.

Kiedrowski MR, Horswill AR (2011) New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1241(2011): 104-121.

Kiedrowski MR, Kavanaugh JS, Malone CL, Mootz JM, Voyich JM, Smeltzer MS, Bayles KW, Horswill AR (2011) Nuclease modulates biofilm formation in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Plos One 6(11): 26714.

Kirby AE (2012) Synergistic Action of Gentamicin and Bacteriophage in a Continuous Culture Population of *Staphylococcus aureus*. PLoS One 7(11): e51017.

Kong KF, Vuong C, Otto M (2006) Staphylococcus quorum sensing in biofilm formation and infection. Int J Med Microbiol 296(2-3): 133-139.

Kuehl R, Al-Bataineh S, Gordon O, Luginbuehl R, Otto M, Textor M, Landmann R (2009) Furanone at subinhibitory concentrations enhances staphylococcal biofilm formation by luxS repression. Antimicrob Agents Chemother 53(10): 4159-4166.

Lee JH, Kim YG, Kim CJ, Lee JC, Cho MH, Lee J (2012) Indole-3-acetaldehyde from Rhodococcus sp. BFI 332 inhibits Escherichia coli O157:H7 biofilm formation. Appl Microbiol Biotechnol 96(4): 1071-1078.

Lin MH, Shu JC, Huang HY, Cheng YC (2012) Involvement of iron in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. Plos One 7(3): 34388.

Lindsey EA, Worthington RJ, Alcaraz CC, Melander C (2012) 2-Aminopyrimidine as a novel scaffold for biofilm modulation. Org. Biomol. Chem., 10: 2552.

Luna CM, Rodriguez-Noriega E, Bavestrello L, Gotuzzo E (2010) Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in Latin America. Rev Chilena Infectol 27(2): 94-103.

Mehndiratta PL, Bhalla P (2012) Typing of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: a technical review. Indian J Med Microbiol 30(1): 16-23.

Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Yolken RH (2003) Staphylococcus; Micrococcus; and Other Catalase-Positive Cocci that Grow Aerobically.ISBN: 978-0-323-08330-0; PII: B978-0-323-08330-0.00014-1; Author: Tille; 00014

O'Gara JP (2007) ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett 270(2): 179-188.

O'Neill E, Pozzi C, Houston P, Smyth D, Humphreys H, Robinson AD, O'Gara JP (2007) Association between Methicillin Susceptibility and Biofilm Regulation in *Staphylococcus aureus* Isolates from Device-Related Infections. Journal of Clinical Microbiology 45(5): 1379-1388.

Obermeier A, Küchler S, Matl FD, Pirzer T, Stemberger A, Mykhaylyk O, Friess WBR (2012) Magnetic Drug Targeting as New Therapeutic Option for the Treatment of Biomaterial Infections. Journal of Biomaterials Science 23(18).

Otto M (2010) Looking toward basic science for potential drug discovery targets against communit-associated MRSA. Med Res Rev. 30(1): 1-22.

Park JH, Ahn MY, Kim YC, Kim SA, Moon YH, Ahn SG, Yoon JH (2012) In Vitro and in Vivo Antimicrobial Effect of Photodynamic Therapy Using a Highly Pure Chlorin e6 against *Staphylococcus aureus* Xen29. Biol Pharm Bull 35(4): 509-514.

Pozzi C, Waters E, Rudkin JK, Schaeffer CR, Lohan AJ, Tong P, Loftus BJ, Pier GB, Fey PD, Massey RC, O'Gara JP (2012) Methicillin Resistance Alters the Biofilm Phenotype and Attenuates Virulence in *Staphylococcus aureus* Device-Associated Infections. Plos Pathog 8(4): 1002626.

Rammelkamp CH, Maxon T (1942) Resistance of *Staphylococcus aureus* to the Action of Penicillin. Proc Roy Soc Exper Biol Med 51: 386-389.

Regiel A, Irusta S, Kyzioł A, Arruebo MSJ (2013) Preparation and characterization of chitosan-silver nanocomposite films and their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. Nanotechnology 24(1).

Revdiwala S, Rajdev BM, Mulla S (2012) Characterization of Bacterial Etiologic Agents of Biofilm Formation in Medical Devices in Critical Care Setup. Critical Care Research and Practice 2012. Volume 2012 (2012), Article ID 945805, 6 pages. http://dx.doi.org/10.1155/2012/945805

Rogers SA, Huigens RW, Cavanagh J, Melander C (2010) Synergistic Effects between Conventional Antibiotics and 2-Aminoimidazole-Derived Antibiofilm Agents. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 54(5): 2112-2118.

Rogers SA, Whitehead DC, Mullikin T, Melander C (2010) Synthesis and bacterial biofilm inhibition studies of ethyl N-(2-phenethyl) carbamate derivatives. Org. Biomol. Chem. 8: 3857-3859.

Rudkin JK, Edwards AM, Bowden MG, Brown EL, Pozzi C, Waters EM, Chan WC, Williams P, O'Gara JP, Massey RC (2012) Methicillin resistance reduces the virulence of healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by interfering with the agr quorum sensing system. J Infect Dis 205(5): 798-806.

Santos AL, Santos DO, Freitas CC, Ferreira BLA, Afonso IF, Rodrigues CR, Castro HC (2007) *Staphylococcus aureus*: visiting a strain of clinical importance. J Bras Patol Med Lab 43(6): 413-423.

SethAK, Geringer MR, Nguyen KT, Agnew SP, Dumanian Z, Galiano RD, Leung KP, Mustoe TA, Hong SJ (2013) Bacteriophage Therapy for *Staphylococcus aureus* Biofilm-Infected Wounds: A New Approach to Chronic Wound Care. Plast Reconstr Surg 131(2): 225-234.

Shirtliff ME, Mader JT, Camper AK (2002) Molecular interactions in biofilms. Chem Biol 9(8): 859-871.

Souza LBGD, Figueired BDB (2008) Prevalência de Infecções Nosocomiais Provocadas por *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (M.R.S.A.), no Hospital Universitário Regional de Maringá. RBAC 40(1): 31-34.

Su Z, Yeagley AA, Su R, Peng L, Melander C (2012) Structural Studies on 4,5-Disubstituted 2-Aminoimidazole-Based Biofilm Modulators that Suppress Bacterial Resistance to beta-Lactams. ChemMedChem. Nov; 7(11):2030-9. doi: 10.1002/cmdc.201200350. Epub 2012 Sep 25.

Thoendel M, Kavanaugh JS, Flack CE, Horswill AR (2011) Peptide signaling in the staphylococci. Chem Rev 111(1): 117-151.

Tsuji BT, MacLean RD, Dresser LD, McGavin MJ, Simor AE (2011) Impact of accessory gene regulator (agr) dysfunction on vancomycin pharmacodynamics among Canadian community and health-care associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Ann Clin Microbiol Antimicrob 10: 20.

Wu X, Wang Y, Tao L (2011) Sulfhydryl compounds reduce *Staphylococcus aureus* biofilm formation by inhibiting PIA biosynthesis. FEMS Microbiol Lett 316(1): 44-50.

Yeagley AA, Su Z, McCullough KD, Worthington RJ, Melander C (2012) N-Substituted 2-aminoimidazole inhibitors of MRSA biofilm formation accessed through direct 1,3-bis(tert-butoxycarbonyl)guanidine cyclization. Org Biomol Chem 11: 130-137.

Yilmaz C, Colak M, Yilmaz BC, Ersoz G, Kutateladze M, Gozlugol M (2013) Bacteriophage Therapy in Implant-Related Infections: An Experimental Study. J Bone Joint Surg Am 95(2): 117-125.

Young BC, Golubchik T, Batty EM, Fung R, Larner-Svensson H, Votintseva AA, Miller RR, Godwin H, Knox K, Everitt RG, Iqbal Z, Rimmer AJ, Cule M, Ip CL, Didelot X, Harding RM, Donnelly P, Peto TE, Crook DW, Bowden R, Wilson DJ (2012) Evolutionary dynamics of *Staphylococcus aureus* during progression from carriage to disease. Proc Natl Acad Sci U S A 109(12): 4550-4555.

KARAUZUM, H.; ADHIKARI, R. P.; SARWAR, J. et al. Structurally designed attenuated subunit vaccines for S. aureus LukS-PV and LukF-PV confer protection in a mouse bacteremia model. PLoS ONE. 8(6): e65384. 2013.

Koch, G.; Yepes, A.; Förstner, K. U.; Wermser, C.; Stengel, S. T.; Modamio, J.; Ohlsen, K.; Foster, K. R.; Lopez, D. Evolution of resistance to a last-resort antibiotic in *Staphyloccocus aureus* via bacterial competitio. Europe PMC Funders Group. 2014. 28; 158(5): 1060–1071.

SOBRE O AUTOR

O pesquisador **GIORGIO SILVA DE SANTANA** possui Graduação em Ciências Biológicas (Licenciatura) na Universidade Salgado de Oliveira em 2005; Mestrado em Patologia Geral na Universidade Federal Fluminense em 2015 (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES); Doutorado em Ciências (Microbiologia) no departamento de Microbiologia Médica na Universidade Federal do Rio de Janeiro em 2022 (Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq); e Pós-Doutorado Nota 10 em Biologia e Fisiologia dos Microrganismos, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ - atual (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do RJ - FAPERJ). Colaborador no desenvolvimento de projetos científicos no Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia (LEMB) do Laboratório Universitário Rodolpho Albino (LURA), Universidade Federal Fluminense (UFF); no Laboratório de Difteria e de Corinebactérias de Importância Clínica (LDCIC) da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Centro Colaborador de Referência e Pesquisa em Difteria (Fundação Nacional de Saúde do Ministério da Saúde); e no Laboratório de Controle Microbiológico (LACOM) do Departamento de Controle de Qualidade em Saúde, Seção de Desenvolvimento de Métodos e Identificação de Microrganismos (SEDIM), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Bio-Manguinhos - atual. Durante sua trajetória acadêmica, participou de diversos projetos em Instituições de Ensino e Pesquisa de excelência, atuando na área microbiológica, com ênfase em Microbiologia Médica e Saúde Pública, relacionada a fatores de virulência e mecanismos de resistência aos antimicrobianos, associados a infecções nosocomiais e comunitárias causadas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Possui conhecimento teórico e prático em modelos de infecção local e sistêmica que utilizam animais de laboratório como ratos *Rattus norvegicus*, camundongos *Mus musculus* e outros.